Zum Problem der Fehlsequenzen bei der Synthese von Peptiden nach der Festkörpermethode

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Eckstein
aus Aalen

1970

Zum Problem der Fehlsequenzen bei der Synthese von Peptiden nach der Festkörpermethode

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heiner Eckstein
aus Aalen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1970

Dekan: Prof. Dr. W. Rüdorff

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

2. Berichterstatter: Doz. Dr. H. Hagenmaier

MEINER MUTTER IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 1968 bis März 1970 unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. E. BAYER

im Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer, danke ich sehr herzlich für die Stellung des Themas, für sein stetes Interesse und für die grosszügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Doz. Dr. H.Hagenmaier bin ich sehr dankbar für viele wertvolle Ratschläge.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0077

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Das Entstehen von Fehl- und Rumpfsequenzen und ihr analytischer Nachweis mittels GC/MS Untersuchungen 4

II. Nachweis von Fehlsequenzen durch Flüssigkeitschromatographie 12

III. Nachweis von Fehlsequenzen mit der ^{19}F-NMR Spektroskopie 14

IV. Kontrolle des Umsatzes während der Merrifieldsynthese

a) photometrische, massenspektroskopische und potentiometrische Methoden 17

b) Semiquantitative Ninhydrinmethode 21

c) Vergleichende Betrachtung der Bestimmungsmethoden 34

d) Zur Strategie der Peptidsynthese 37

V. Verbesserte Synthese mehrfunktioneller, geschützter Aminosäurederivate 39

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Die Durchführung der Merrifieldsynthese

1) Reaktionsgefässe 41

2) Veresterung des Harzes mit der ersten Boc-Aminosäure 43

3) Peptidsynthese 43

4) Durchführung der semiquantitativen Ninhydrinmethode 43

5) Abspalten der Peptide vom Harz

a) mit HBr/Trifluoressigsäure 45

b) mit Hydrazin 46

Seite

II. Synthese der Peptide 46
1) Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$ 46
2) Synthese von $(Gly\text{-}Val)_3\text{-}(Leu\text{-}Ala)_6$ 46
3) Synthese der Partialsequenz 81 - 89 des Spermwal Myoglobins 47
III. Durchführung der Aminosäureanalysen 48
IV. Untersuchungen zur Aminolyse der Peptidesterbindung 49
V. Partialhydrolysen und GC/MS Untersuchungen 49
VI. Darstellung der Aminosäurederivate
1) Aminosäurederivate mehrfunktioneller Aminosäuren 52
2) Aminosäure-methylester 56
3) Boc-Aminosäurederivate 59
4) Boc-Aminosäure-p-nitrophenylester 59
5) Dipeptide 61
VII. Reinigung der Lösungsmittel 63
VIII. Geräte 65

D. ZUSAMMENFASSUNG 66

E. LITERATURVERZEICHNIS 67

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

GC	Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernmagnetische Resonanz
Boc-	tert.-Butoxycarbonyl-gruppe
Cbo-	Carbobenzoxy-gruppe (Benzyl-oxycarbonyl-gruppe)
Dpoc-	2-(p-Diphenyl)-isopropyl-ocycarbonyl-gruppe
-ONP	p-Nitrophenylester
Tos-	p-Toluolsulfonsäure-gruppe
Bzl-	Benzyl-gruppe
Ac-	Acetylgruppe (AcOH Eisessig)
-Me	Methylgruppe (Me bei Schmelzpunktsangabe: aus Methanol umkristallisiert)
TFA	Trifluoressigsäure oder Trifluoracetylrest
DMF	N,N'-Dimethyl-formamid
TEA	Triäthylamin
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
N^{im}	substituierter Stickstoff im Imidazolring
meq.	Milliäquivalente
d.Th.	der Theorie
i.v.	im Vakuum
ib.	lat. ibidem, ebenda
et al.	und Mitarbeiter

Die Abkürzungen der Aminosäuren erfolgten nach den Richtlinien der IUPAC. Es wurden ausschliesslich L-Aminosäuren verwendet.

A. EINLEITUNG

Nachdem 1962 von R.B.Merrifield (1,2) die Peptidsynthese am festen Träger eingeführt wurde, haben sich viele Arbeitskreise mit dieser vielversprechenden Methode befasst. Inzwischen haben sich die Bezeichnungen "Festkörpersynthese" oder auch "Merrifieldsynthese" allgemein eingebürgert. Im Prinzip soll durch das Wachstum der Peptidkette an einem unlöslichen Träger die Synthese beschleunigt und zugleich einfacher werden.
Die C-terminale Aminosäure wird bei der Festkörpersynthese an ein Harz kovalent gebunden. Dann erfolgt die schrittweise Verknüpfung der Aminosäuren zur Peptidkette und endlich die Abspaltung des vollständigen Peptids vom festen Träger.
Da das wachsende Peptid an einem unlöslichen Harz fixiert ist, lassen sich alle löslichen Nebenprodukte und Reagentien durch Auswaschen und Filtrieren einfach und schnell entfernen. So werden die Zwischenprodukte nicht durch die üblichen, zeitraubenden Umkristallisierungsmethoden gereinigt, sondern durch Herauslösen der Verunreinigungen. Die Methode ist deshalb so bestechend, weil die gesamte Synthese praktisch immer nur eine einfache Arbeitsoperation erfordert, nämlich Filtrieren. Es bietet sich so die Automatisierung der Peptidsynthese an (1).
Von der klassischen Peptidsynthese her stehen sehr viele Schutzgruppen zur Verfügung, so dass auf diese zurückgegriffen werden kann.
Das Hauptproblem der Merrifieldsynthese liegt darin, die Carboxylkomponente so zu aktivieren, dass sie in hoher Ausbeute kuppelt und zu keinen Nebenreaktionen führt. Am besten gelingt diese Aktivierung mit der Carbodiimidmethode von J.C.Sheehan und G.P.Hess (3,4), die heute fast ausschliesslich angewendet wird. Dennoch

ist es grundsätzlich nicht immer möglich, die Ausbeute jedes Kupplungsschrittes auf 100% zu bringen. Dies gilt insbesonders bei der Verwendung von Aminosäure-p-nitrophenylestern.

Nach der ersten erfolgreichen Synthese eines Tetrapeptids (2) und eines Nonapeptid-Hormons (5) von R.B.Merrifield erfolgten auch von anderen Arbeitskreisen viele Peptidsynthesen, die mehr oder weniger erfolgreich verliefen. Es hat sich inzwischen gezeigt, dass eine Kontrolle des Umsatzes während eines jeden Kupplungsschrittes unerlässlich ist. Erst 1968, also sechs Jahre später, wurde über Kontrollmethoden berichtet, die eine Bestimmung des Umsatzes ermöglichen (6,7,8).

Die von F.Weygand et al. und K.Esko et al. beschriebenen Methoden sind sehr zeitraubend. Daher wurde in dieser Arbeit eine Methode ausgearbeitet, die auf der Reaktion von Ninhydrin mit den freien Aminogruppen beruht, die nach dem Umsatz noch vorhanden sind. Die gleichzeitig von L.C.Dorman (8) beschriebene Methode eignete sich ausgezeichnet, die "Ninhydrin-Methode" zu überprüfen. Dem Nachteil, dass letztere nur semiquantitativ ist, steht der Vorteil der schnelleren und einfacheren Durchführung gegenüber. Zusätzlich lässt sich die Kupplungsreaktion kinetischverfolgen.
Es liegt nun nahe, die während der Kupplungsreaktion nicht umgesetzten Aminogruppen nachträglich zu blockieren. Zuerst wurde von R.B.Merrifield (2) vorgeschlagen, die freien Aminogruppen zu acetylieren, um auf diese Weise die Bildung von Fehlsequenzen zu vermeiden. Ausserdem sollten sich die acetylierten Rumpfsequenzen leichter vom gewünschten Peptid abtrennen lassen. In späteren Arbeiten jedoch wurde die Acetylierung ohne weitere Begründung wieder fallen gelassen (5). Daher wurde in

dieser Arbeit die Acetylierung wieder aufgenommen, da sich ihr Wert mit Hilfe von Umsatzkontrollen leicht überprüfen lässt.
Daneben wurde versucht, die zwangsläufig entstehenden Fehlsequenzen semiquantitativ zu erfassen, die von E.Bayer et al. (9,10) mit gaschromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden definitiv nachgewiesen werden konnten.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Das Entstehen von Fehl- und Rumpfsequenzen und ihr analytischer Nachweis mittels GC/MS Untersuchungen

Wenn eine Kupplung nicht zu 100% verläuft, bleiben freie Aminogruppen übrig, für deren Verbleib folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden müssen:

1.) Sie reagieren bei späteren Kupplungsschritten.
2.) Sie sind sterisch so schwer zugänglich, dass sie nicht mehr weiter an späteren Kupplungen teilnehmen können.
3.) Die Aminogruppen nehmen an Nebenreaktionen teil.

Zu 1.) Reaktionsfähige freie Aminogruppen

Eine Reaktion nicht umgesetzter Aminogruppen zu einem späteren Zeitpunkt führt zwangsläufig zur Bildung von Fehlsequenzen, wobei eine oder mehrere Aminosäuren ausgelassen werden können. Um die Zahl der Fehlsequenzen möglichst gering zu halten, sind hohe Ausbeuten von grösster Wichtigkeit. Besonders ungünstig wirkt sich die Tatsache aus, dass die Zahl der Fehlsequenzen binomisch wächst (11), während das Gewicht des zu synthetisierenden Peptids bei wachsender Peptidkette lediglich linear anwächst. Die zu erwartenden Ausbeuten an Endprodukt sind in Fig. 1 für ein Dodekapeptid, die Insulin B Kette, Apoferredoxin, Ribonuklease und Myoglobin dargestellt. Die Berechnungen sind für 99% und 90% Umsatz bei jedem Kupplungsschritt durchgeführt und setzen voraus, dass jede Aminosäure statistisch kuppelt.
Besteht ein Peptid aus n Aminosäuren, so ist die Zahl der Fehlsequenzen, denen eine Aminosäure fehlt, n-1. Alle n-1 Fehlpeptide können vom Hauptprodukt immer

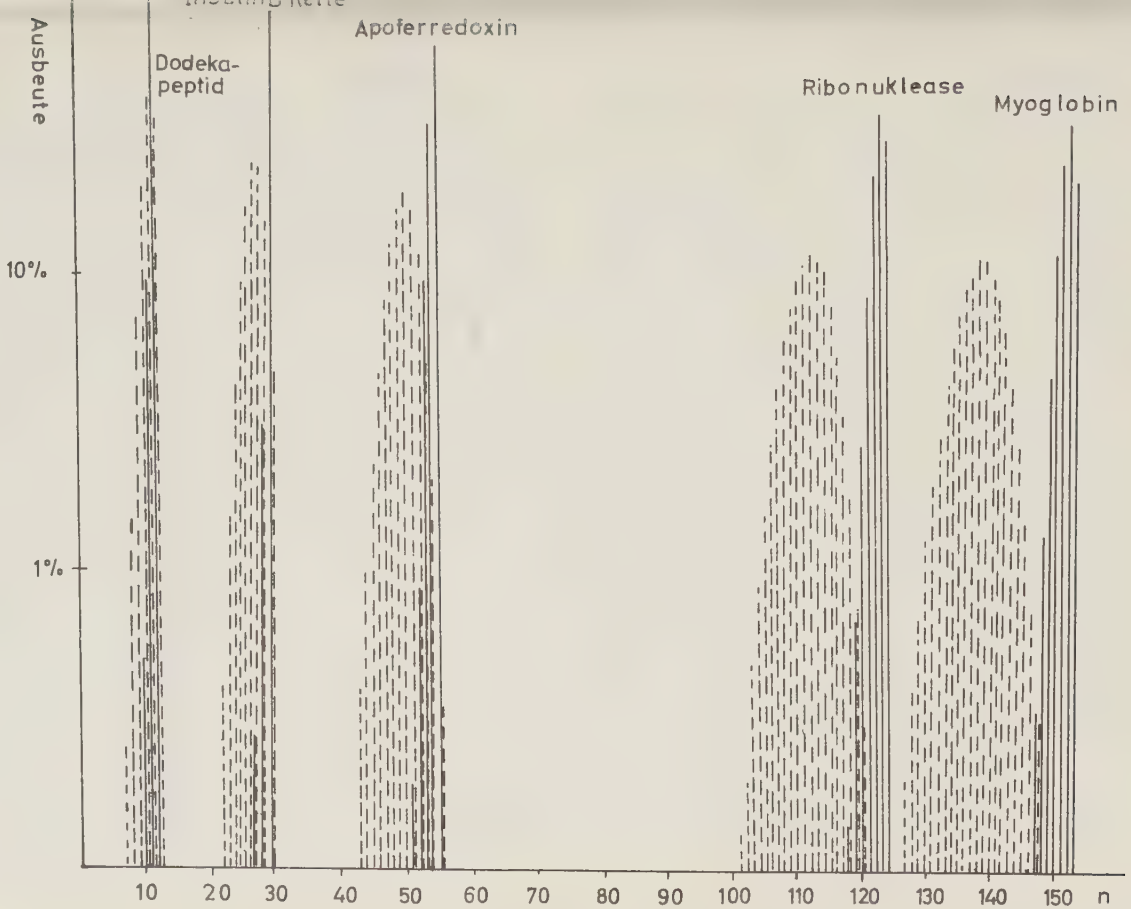


Fig. 1: Ausbeuten an Fehlsequenzen und Endprodukt bei der Merrifield-Synthese eines Dodekapeptids, der Insulin B Kette, des Apoferredoxins, Myoglobins und der Ribonuklease. n = Aminosäurereste.
---- 90%, —— 99% Umsatz je Kupplungsschritt (12).

schwerer abgetrennt werden, je länger das Peptid ist.

Es gibt bis jetzt keine Methode, die es generell erlaubt, die Anwesenheit oder das Fehlen solcher Fehlpeptide zu erkennen. Für ein Dodekapeptid würden z.B. 11 Undekapeptide existieren, von denen ein Peptid die Aminosäure 2, ein anderes die Aminosäure 3 nicht enthält und so fort. Es gibt also 11 verschiedene Undekapeptide, alle mit verschiedener Sequenz, die aber im Gemisch eine Aminosäureanalyse ergeben, die genau der des Hauptprodukts entspricht. Wenn also alle Fehlsequenzen in statistischer Verteilung vorhanden wären, wird exakt die Aminosäureanalyse des gewünschten Produkts erhalten. Daraus folgt unmittelbar, dass eine Aminosäureanalyse nach der Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure-Abspaltung bezüglich der Reinheit des Produkts keinerlei Aussagekraft hat. Besonders unübersichtlich werden die Verhältnisse dann, wenn die einzelnen Aminosäuren mehrmals im Peptid enthalten sind.

Solche Fehlsequenzen sollten sich hingegen in Peptiden feststellen lassen, die eine alternierende Sequenz aufweisen, wie z.B. $(Leu\text{-}Ala)_6$. Für jedes fehlende Alanin muss eine ...Leu-Leu... Sequenz entstehen, für jedes fehlende Leucin eine ...Ala-Ala... Sequenz. Nach der Partialhydrolyse müssen dann vier Sorten von Dipeptiden im Hydrolysat zu finden sein: Leu-Leu, Ala-Ala, Leu-Ala und Ala-Leu (12,13,14).

Die Bestimmung solcher Dipeptide in Partialhydrolysaten bereiten grundsätzlich keine Schwierigkeiten, wenn man sie in TFA-Peptid-Ester überführt und gaschromatographisch analysiert. Mit einem gekoppelten Massenspektrometer lassen sich so leicht die einzelnen Peaks in den Gaschromatogrammen den jeweiligen Dipeptiden zuordnen. Man kann durch GC/MS-Analysen schnell und bequem das Verhältnis der vier Dipeptide zueinander bestimmen. Leider ist das

Verhältnis der Leu-Leu und Ala-Ala Fehlpeptide nicht repräsentativ für alle Fehlpeptide, die das Hauptprodukt verunreinigen. Dies wäre nur bei statistisch verlaufender Hydrolyse der Fall. Dagegen wird aus sterischen Gründen eine Leu-Leu Bindung langsamer hydrolysiert als eine Ala-Ala Bindung. Tab. 1 bestätigt diesen Sachverhalt.
Wie später noch gezeigt wird, kuppelt Boc-Leucin schlechter an ein Ala-Peptid als Boc-Alanin an ein Leu-Peptid kuppelt. Folglich müssten mehr Ala-Ala als Leu-Leu Fehlpeptide gefunden werden. Da dies nicht der Fall ist, muss die Ala-Ala Bindung schneller hydrolysieren als die Leu-Leu Bindung. Standardisieren der Partialhydrolyse lässt jedoch eine Aussage über die Zahl der vorhandenen Fehlpeptide zu, verglichen mit einer Synthese desselben Peptids mit veränderten Synthesebedingungen (z.B. Acetylieren, längere Reaktionszeiten).

Zuerst sollte untersucht werden, welchen Einfluss Säurekonzentration und Hydrolysezeit auf die Dipeptidbildung ausüben. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

		Ala-Ala	Leu-Ala	Ala-Leu	Leu-Leu
HCl_c	4 Tage	5,8	60,0	11,0	23,2
HCl_c/TFA	(3:2) 4 Tage	8,5	55,6	11,3	24,7
TFA	4 Tage	11,2	59,3	10,9	18,6
HCl_c	7 Tage	5,8	54,0	13,2	27,1

Tab. 1: Verhältnis der Dipeptide nach der Partialhydrolyse eines $(Leu\text{-}Ala)_6$ Peptids bei 37°C unter verschiedenen Hydrolysebedingungen. Die Zahlen bedeuten %-Dipeptid, bezogen auf alle vorhandenen Dipeptide.

Säurekonzentration und Hydrolysendauer üben keinen Einfluss aus; Trifluoressigsäure verschiebt die Verhältnisse etwas.

Zu 2.) und 3.) Sterische Hinderung und Nebenreaktionen der freien Aminogruppen

Bei vielen Peptidsynthesen blieb die Zahl der Aminogruppen, die nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe gefunden wurde, während der ersten vier Kupplungsschritte konstant. Dann

nahm die Zahl der Aminogruppen zuerst stärker, dann schwächer ab, um in späteren Kupplungsschritten wieder näherungsweise konstant zu bleiben. Für dieses Verhalten sind drei Möglichkeiten zu diskutieren. Einmal könnte eine Aminolyse der Esterbindung, mit der das Peptid an das Harz gebunden ist, stattfinden. Reaktion der freien Aminogruppe mit der Esterbindung der eigenen Peptidkette führt zu einem cyclischen Peptid ("cyclische Aminolyse"). Reagiert sie mit der Esterbindung einer benachbarten Peptidkette, verdoppelt sich das Peptid. Beide Möglichkeiten sind in Fig. 2 schematisch dargestellt.

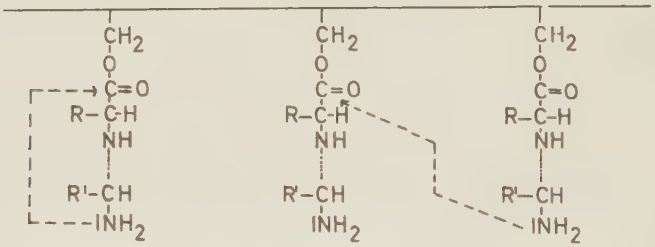


Fig. 2: Aminolyse der Peptidesterbindung durch die freien Aminogruppen des Peptids.

Um diese Möglichkeiten der Aminolyse nachzuprüfen, wurde ein Dipeptid Leu-Ala synthetisiert, bei dem Alanin mit der Carboxylgruppe an das Harz gebunden war und die Aminogruppe des Leucins ungeschützt vorlag.

Nach verschieden langen Reaktionszeiten zeigte die Aminosäureanalyse des Filtrats zwei Ninhydrin-positive Substanzen, die nach ihren Rf-Werten weder Alanin noch Leucin sein konnten. Das cyclische Dipeptid wurde bei der Aufarbeitung in zwei lineare Dipeptide Leu-Ala und Ala-Leu aufgespalten. So erklärt sich, dass bei der Aminsäureanalyse z w e i Verbindungen nachgewiesen werden konnten.

Abspalten mit HBr/Trifluoressigsäure sollte neben Leu-Ala noch Leu-Ala-Leu-Ala ergeben, falls die Aminolyse einer be-

nachbarten Benzylesterbindung stattgefunden hat. Von dem Trifluor-tetrapeptid-methylesterderivat wurde ein Massenspektrum angefertigt. Es ergaben sich mehrere m/e-Werte, die über der Massenzahl des Leu-Ala (312) lagen. Es konnten jedoch keine charakteristischen Masseneinheiten gefunden werden, die einen Schluss auf ein Tetrapeptid zugelassen hätten+). Dennoch folgt daraus keinesfalls, dass die "cyclische Aminolyse" (Diketopiperazinbildung) etwa bevorzugt abläuft. Bei Dipeptiden ist die Diketopiperazinbildung gegenüber der Transpeptidierung sterisch begünstigt. Es ist aber bei längeren Peptidketten durchaus damit zu rechnen, dass allein schon aus statistischen Gründen die Transpeptidierung gegenüber der "cyclischen Aminolyse" überwiegt, besonders dann, wenn Glutaminsäure und Asparaginsäure im Peptid enthalten sind, da deren ω-Esterbindungen ebenfalls von freien Aminogruppen angegriffen werden können.
Diese Nebenreaktionen führen wohl zu einer Abnahme an freien Aminogruppen, die aber einen mehr oder weniger gleichmässigen Abfall während der gesamten Synthese bewirken sollten.

Eine bessere Deutung des auf S.7 aufgezeigten Sachverhaltes lässt sich geben, wenn man die Struktur des Polymers in Betracht zieht. In den "Taschen" des Polymers ist der Raum begrenzt, und es können nur die aus den Taschen herausragenden Peptidketten an der Kupplungsreaktion teilnehmen. Zu Beginn der Synthese sind noch alle freien Aminogruppen zugänglich; mit wachsendem Peptid werden in zunehmendem Mass freie Aminogruppen von der Umgebung abgeschnitten und sind von der Peptidsynthese ausgeschlossen. Hat die Kettenlänge nun eine gewisse Länge erreicht, reagieren nur noch die an der Oberfläche vorhandenen Pep-

---

+) Herrn Dr. W.König danke ich für die Interpretation dieser Massenspektren.

tidketten und diejenigen, die inzwischen aus den inneren Hohlräumen des Harzes herausgewachsen sind. Ab diesem Zeitpunkt sollte die Zahl der freien Aminogruppen konstant bleiben. Dies wurde experimentell auch gefunden (s.S. 7). Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz und anschliessender Hydrolyse findet man durch Aminosäureanalyse im allgemeinen einen viel zu hohen Wert für die erste Aminosäure und einen ebenfalls zu hohen Wert für die zweite Aminosäure im Vergleich zu den restlichen Aminosäuren. Auch dieses experimentelle Ergebnis fügt sich gut in die oben gegebene Deutung ein.
Die auf diese Weise entstandenen Rumpfsequenzen sind klein, verglichen mit dem Hauptprodukt, und sollten sich leicht abtrennen lassen.

Führt dagegen eine Verknäuelung der Peptidkette zur sterischen Abschirmung freier Aminogruppen, so können diese durchaus zu einem späteren Zeitpunkt wieder an der Kupplungsreaktion teilnehmen und zu Fehlsequenzen führen, die sich natürlich nur schwierig abtrennen lassen. Ein Teil der Fehlsequenzen lassen sich vermeiden, indem man nach der Kupplung mit mehreren verschiedenen Lösungsmitteln wäscht, die unterschiedliche Polarität und Quellvermögen besitzen (Dimethylformamid, Äthanol, eventuell auch Hexamethylphosphorsäuretriamid oder Tetramethylharnstoff). Wird nun die Kupplung mit derselben Aminosäure wiederholt, besteht die Möglichkeit, dass vorher gehinderte Aminogruppen bei den Waschvorgängen freigelegt werden, die nunmehr wieder an der Reaktion teilnehmen können. Die Zweckmässigkeit mehrmaligen Umsetzens ergibt sich direkt aus Tab. 4.

Eine weitere Ursache für die Abnahme der freien Aminogruppen während der Synthese könnte die HCl/Eisessigbehandlung sein. In Gegenwart von nur geringen Mengen Feuchtigkeit kann der Säuregrad so gross werden, dass eine merkliche

Hydrolyse der Peptidesterbindung eintreten kann. Aus diesem Grund wurden die Filtrate der Essigsäure- und der Essigsäure/Chlorwasserstoffbehandlung aufgefangen, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 6N HCl 3 Tage hydrolysiert. Durchgeführt wurde die Bestimmung nach der 9. Kupplungsstufe (Boc-Leu⟶Ala-Leu-....-Ala-Harz) und nach der 10. Kupplung (Boc-Ala⟶Leu-Ala-....-Ala-Harz). Die Aminosäureanalyse ergab folgende Verhältnisse:

Kupplung von Boc-Leu	0,291 µMol Leu
	0,519 µMol Ala
	0,117 µMol Gly (?)
Kupplung von Boc-Ala	0,360 µMol Leu
	0,285 µMol Gly (?)
	1,540 µMol Ala

In beiden Aminosäureanalysen tritt an der Stelle von Glycin eine Ninhydrin-positive Substanz auf, die nicht zugeordnet werden kann. Bei der Kupplung von Boc-Alanin ist in der Aminosäureanalyse ein relativ grosser Anteil Alanin zu erwarten, da trotz der vielen Waschvorgänge immer noch etwas Acylharnstoff des Alanins vorliegen kann, der sich erst mit Essigsäure und HCl/Eisessig quantitativ herauswaschen lässt. Wichtig ist die Anwesenheit von Leucin u n d Alanin in der Aminosäureanalyse. Daraus geht eindeutig hervor, dass eine bestimmte Menge des Peptids abgespalten worden ist. Sie lässt sich berechnen aus der Menge Harz und der Beladung. In diesem Fall wurden 4 g Harz mit einer Beladung von insgesamt 0,6 mMol Alanin verwendet (genaue Angaben s.Tab.4). Unter Vernachlässigung aller Rumpfsequenzen sind dann 5.0,6 = 3 mMol Leucin im Reaktionsgefäss. Davon wurden 0,36 µMol Leucin im Filtrat wiedergefunden, es wurde also Peptid in der Grössenordnung von 0,1‰ vom Harz abgespalten. Dies ist nur ein sehr geringer Bruchteil, der nicht ins Gewicht fallen sollte. Es ist jedoch zu beachten, dass bei dieser Synthese ganz besonders auf Wasserausschluss geachtet wurde (s.exp.Teil S.63f).

II. Nachweis von Fehlsequenzen durch Flüssigkeits-Chromatographie

Das von R.B.Merrifield (2) synthetisierte Tetrapeptid Leu-Ala-Gly-Val liess sich chromatographisch in mehrere Fraktionen auftrennen:

Leu-Ala-Gly-Val	71%
Leu-Ala-Gly-D-Val	5%
Leu-Ala-Val	2%
Gly-Val und Ala-Gly-Val	8%
Leu-Val	1%
Leu	5%
Val	1%
Acetylierte Peptide ca.	7%

Aus diesem Ergebnis lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

a) Es sind alle theoretisch möglichen Rumpfsequenzen vorhanden (9%).
b) Es sind Fehlsequenzen vorhanden (3%).
c) Nur etwa die Hälfte der freien Aminogruppen, die nach der Kupplung noch vorhanden waren, liessen sich durch Acetylieren blockieren.

Etwa die gleichen Verhältnisse ergaben sich bei der Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$; auch mehrmaliges Wiederholen der Acetylierung ergab keine quantitative Blockierung der freien Aminogruppen (s.Tab. 4 und Tab. 5).
Der grosse Prozentsatz an Rumpf- und Fehlsequenzen bei der Synthese des Tetrapeptids dürfte auf die Verwendung der Carbobenzoxy-Schutzgruppe (Cbo-Schutzgruppe) zurückzuführen sein, die sich wahrscheinlich nicht immer quantitativ abspalten liess. In eigenen Experimenten verliefen die Kupplungen während der ersten 5 Aminosäuren immer quantitativ, da die säurelabile Boc-Schutzgruppe verwendet wurde.

Die chromatographische Trennung eines Peptidgemisches, das bei der Merrifieldsynthese zwangsläufig entsteht, bereitet naturgemäss erhebliche Schwierigkeiten. In speziellen Fällen konnte eine Trennung in die einzelnen Sequenzen erfolgreich durchgeführt werden. O.Grahl-Nielsen und G.L.Tritsch (15) synthetisierten oligomere Lysinpeptide. Bei der chromatographischen Untersuchung eines nach Merrifield synthetisierten Deka-Lysinpeptids konnten alle Rumpfsequenzen gefunden werden. In diesem Fall kann über die Bildung von Fehlsequenzen natürlich keine Aussage gemacht werden, da zwischen Rumpf- und Fehlsequenzen nicht unterschieden werden kann.

III. Nachweis von Rumpf- und Fehlsequenzen mit der ^{19}F-NMR Spektroskopie

Wie von R.E.Sievers, E.Bayer und P.Hunziker (16) gezeigt wurde, können mit der ^{19}F-NMR Spektroskopie kleine Strukturunterschiede in TFA-Peptiden festgestellt werden. Bemerkenswert ist, dass hier die Fluorverschiebungen nicht nur von der direkt gebundenen Aminosäure bestimmt werden, sondern auch deutlich von der darauffolgenden Aminosäure beeinflusst werden. Hinzu kommt noch, dass das Fluorsignal sehr empfindlich ist, da das Verhältnis des kernmagnetischen Moments und des Kernspins relativ gross ist.
So ergab das ^{19}F-NMR Spektrum eines Gemisches aus TFA-Gly-Leu-OMe und TFA-Gly-Ala-OMe zwei deutlich voneinander getrennte Signale. Da keine Spin-Spin Wechselwirkung auftritt, erhält man Singulettspektren, die einfach zu deuten sind. Im Gegensatz zu gaschromatographischen Untersuchungen können hier auch schwer flüchtige Verbindungen untersucht werden.
Es sollte geprüft werden, ob auch trifluoracetylierte Peptide, die noch an das Harz gebunden sind, direkt NMR-spektroskopisch untersucht werden können. Dazu wurden Harze hergestellt, die Ala, Pro und Leu enthielten. Dann wurde trifluoracetyliert und die NMR Spektren[+]) in Aceton (geringes Quellvermögen) und Hexamethylphosphorsäuretriamid (sehr starkes Quellvermögen) aufgenommen. Wie befürchtet, waren die Banden stark verbreitert (Halbwertsbreite ca. 0.2 p.p.m.). Die direkte Untersuchung trifluoracetylierter Peptidharze ist daher nur begrenzt möglich.
Werden die Peptide jedoch vom Harz abgespalten und trifluoracetyliert, dann treten starke Fluorverschiebungen auf.

[+]) Herrn Dipl. Chem. P.Hunziker danke ich für die Aufnahme und Auswertung der NMR Spektren.

Dies zeigt ein ^{19}F-NMR Spektrum eines trifluoracetylierten $(Leu\text{-}Ala)_6$-Peptids, das deutlich drei verschiedene Signale erkennen lässt.

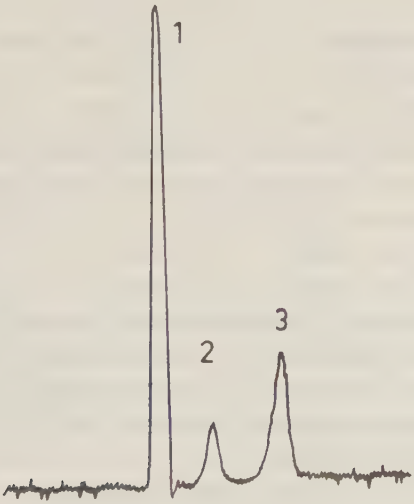


Fig. 3: ^{19}F-NMR Spektrum von TFA-Leu-$(Ala\text{-}Leu)_5$-Ala-OH in Hexamethylphosphorsäuretriamid. Temp. 30°C, Varian HA-60 (54,6 MHz).

Signal 1 entspricht vermutlich Peptiden mit der Endgruppe TFA-Leu-Ala-...., Signal 3 Peptiden mit der Endgruppe TFA-Ala-Leu-...., während Signal 2 von Fehlsequenzen herrühren könnte, z.B. TFA-Leu-Leu-Ala-.... oder TFA-Ala-Ala-Leu-.... Eine genaue Zuordnung kann nicht getroffen werden, da sich das trifluoracetylierte Peptid nur zum Teil in Hexamethylphosphorsäuretriamid löste.

Um einen weitergehenden Einblick in die Empfindlichkeit der ^{19}F-NMR Spektroskopie zu erhalten, wurden mehrere, völlig verschiedene TFA-Dipeptidmethylester dargestellt und

deren Fluorresonanzspektren aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Tab. 2 wiedergegeben:

	p.p.m. bezogen auf CF_3COOCH_3
TFA-Pro-Val-OMe	0.38
TFA-Lys(TFA)-Val-OMe	0.24 und 0.60
TFA-Val-Tyr(OH)-OMe	0.10
TFA-Ala-Leu-OMe	0.36

Tab. 2: Die ^{19}F-Verschiebungen von Dipeptiden. Lösungsmittel Aceton mit Trifluoressigsäuremethylester als innerem Standard.

Aus Tab. 2 lässt sich ersehen, dass die bei der Synthese eines Lys(Cbo)-Pro-Val-.....-Peptids möglicherweise entstandene Fehlsequenz Lys(Cbo)-Val-....-Peptid ohne Schwierigkeiten erkannt werden sollte. Es ist anzunehmen, dass der übrige Rumpf des Peptids die Fluorverschiebung nicht mehr wesentlich beeinflussen wird.
Im Vergleich zu den von R.E.Sievers, E.Bayer und P.Hunziker beschriebenen Peptiden (16), die Alanin enthielten, weist das TFA-Ala-Leu-OMe mit 0.36 p.p.m. die grösste Fluorverschiebung auf (bezogen auf Trifluoressigsäuremethylester).

Ein Vorteil dieser neuen Methode ist die Empfindlichkeit. Eine Verunreinigung eines Peptids mit mehr als 3% einer Fehlsequenz kann ohne Schwierigkeiten festgestellt werden.

IV. Kontrolle des Umsatzes während der Merrifield-Synthese.

a) Photometrische, massenspektrometrische und potentiometrische Bestimmungsmethoden.

Zur erfolgreichen Durchführung einer Merrifield-Synthese ist es unbedingt notwendig zu wissen, wie weit die Kondensationsreaktion (Kupplung) vorangeschritten ist. Seit einiger Zeit sind Methoden bekannt, die sich mit der Kinetik solcher Reaktionen befassen (6,7).
Die von F.Weygand und R.Obermeier (6) beschriebene Methode der massenspektroskopischen Verdünnungsanalyse beansprucht einen erheblichen Zeitaufwand. Nach dem Prinzip des Edman-Abbaus von Peptiden wird nach der Kupplung ein Teil des Peptidharzes entnommen. Zu einer genau eingewogenen Menge des Harzes wird Phenylsenföl zugesetzt, welches mit der nicht umgesetzten, endständigen Aminosäure das entsprechende Hydantoin bildet. Setzt man eine definierte Menge p-Fluorhydantoin derselben Aminosäure zu, dann kann aus dem Massenspektrum das Massenverhältnis von Hydantoin zu p-Fluorhydantoin entnommen werden. Aus dem Massenverhältnis kann auf das Mengenverhältnis und somit auf die Menge nicht umgesetzter Aminosäure geschlossen werden. Der Zeitaufwand beträgt 6 Stunden, die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren nicht gerechnet. Daneben benötigt man alle p-Fluorhydantoinderivate der zu bestimmenden Aminosäuren. Daher dürfte diese Methode nur in speziellen Fällen Verwendung finden.
K.Esko, S.Karlsson und J.Porath (7) verwenden 2-Hydroxy-1-naphtaldehyd zur Kondensation mit den nicht umgesetzten Aminogruppen. Das mit Benzylamin freisetzbare 2-Hydroxy-1-naphtyliden-benzylamin kann photometrisch bestimmt werden. Die Reaktion des Benzylamins mit dem 2-Hydroxy-1-naphtyliden-peptidpolymeren benötigt 12 Stunden.

Beide Methoden haben den Nachteil, dass merkliche Mengen Harz zu jeder Bestimmung entnommen werden müssen. Zusätzlich muss das Harz sorgfältig gewaschen und getrocknet werden. Wägefehler sind nicht auszuschliessen. Der grosse Zeitaufwand von 12 bis 14 Stunden macht eine Verwendung dieser Methoden zur Synthesekontrolle unmöglich.

Die von M.Bodanszky und J.T.Sheehan (17) beschriebene kolorimetrische Methode kann nur dann angewendet werden, wenn während der Kupplungsreaktion eine farbige Gruppe abgespalten wird. Setzt man z.B. p-Nitrophenylester der Boc-aminosäuren ein, dann lässt sich das entstehende p-Nitrophenol in alkalischem Medium photometrisch bestimmen (17, 18,19). Zieht man die Absorption des überschüssigen p-Nitrophenylesters (270 nm) zusätzlich mit heran, kann die Sicherheit der Methode vergrössert werden (17).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Methoden wird hier der gesamte Ansatz zur Bestimmung verwendet, wodurch die Genauigkeit der Bestimmung erhöht wird. Allerdings werden das p-Nitrophenol und der aromatische Boc-aminosäure-p-nitrophenylester von den aromatischen Ringen des Harzes hartnäckig festgehalten und lassen sich nur schwer quantitativ auswaschen.

L.C.Dorman (8) beschreibt eine Methode, die es gestattet, den Gesamtumsatz in verhältnismässig kurzer Zeit zu bestimmen. Sie ist gleichzeitig ausgezeichnet zur Bestimmung der totalen Menge freier Aminogruppen geeignet, die nach der Abspaltung der Boc-Gruppe vorliegen. Auch hier wird der gesamte Ansatz zur Bestimmung herangezogen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit neben der weiter unten diskutierten "semiquantitativen Ninhydrinmethode" als Synthesekontrolle verwendet. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz mit einer Lösung von Pyridinhydrochlorid in Methylenchlorid geschüttelt, wobei die freien Aminogruppen in das Hydrochlorid überführt werden. Mit Dimethylformamid lässt sich das überschüssige Pyridinhydrochlorid

auswaschen. Triäthylamin in Dimethylformamid übernimmt als stärkere Base die Wasserstoffionen und kann als Triäthylammoniumchlorid mit Dimethylformamid quantitativ herausgewaschen werden. Die Chloridionen können nun in saurem Medium mit einer Ag/AgCl-Elektrode potentiometrisch sehr genau bestimmt werden. Die Genauigkeit dieser Methode steht und fällt mit der Reinheit des Dimethylformamids. Das handelsübliche Dimethylformamid[1] enthält neben etwas Wasser eine geringe Menge Dimethylamin und Methylamin. Beide Amine können nun wie das Triäthylamin Chloridionen beim Waschen mit herausschleppen, die der eigentlichen Bestimmung verloren gehen. Daher ist es unerlässlich, das handelsübliche Dimethylformamid von Aminen zu befreien[2]. Trotz sorgfältiger Aufbewahrung (Kühlschrank und unter Stickstoff) bilden sich Amine nach. Deshalb wurde vor jedem Cyclus mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol auf Amine geprüft (20). Als frei von Aminen galt Dimethylformamid dann, wenn mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol keine Farbreaktion mehr eintrat (Extinktion unter 0,1).

Vor Beginn der Synthese muss der Blindwert der Chloridionen bestimmt werden, der durch ihre unspezifische Adsorption hervorgerufen wird. Es ist unbedingt notwendig,diesen Wert möglichst genau zu bestimmen. Bezeichnet man die Menge der Chloridionen, die nach der Abspaltung der Boc-Gruppe titrimetrisch erfasst werden können mit m_t, den Blindwert mit m_B und die nach der Kupplung erfassbare Chloridionenmenge mit m_K, so errechnet sich der Prozent-

---

1) Dimethylformamid (LAB), E.Merck, Darmstadt

2) Über die Reinigung der Lösungsmittel wird im experimentellen Teil berichtet

satz an freien Aminogruppen, die nicht umgesetzt worden sind, zu

$$\frac{m_K - m_B}{m_t - m_B} \cdot 100\% \qquad \text{(Gl.1)}$$

Bei hohen Umsatzraten oder geringer Beladung können m_K und m_B in vergleichbarer Grösse vorliegen. Dann verursacht ein Fehler in m_B einen beträchtlichen Fehler bei der Bestimmung der Aminogruppen, die nicht reagiert haben. Dies lässt sich am Beispiel einer Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$ verdeutlichen. Verwendet wurden 4 g mit Boc-Alanin beladenes Harz, dessen Blindwert dreimal bestimmt wurde zu 0,100 0,108 und 0,087 mMol Cl^-, also mit einem Fehler von ± 10%. Berechnet werden soll der Fehler der Umsatzbestimmung bei der Kupplung der 6. Aminosäure (Boc-Leucin) an das Peptidharz. Die potentiometrische Chloridionenbestimmung nach der HCl/Eisessigbehandlung der 5. Aminosäure ergab einen Gehalt an freien Aminogruppen (m_t) von 1,10 mMol. Nach der Kupplung wurde ein m_K-Wert von 0,108 gefunden. Nach Gl.1 berechnet sich daraus die Zahl der nicht umgesetzten Aminogruppen für

$m_B = 0{,}100$ zu $\frac{0{,}108 - 0{,}100}{1{,}100 - 0{,}100} \cdot 100\% = 0{,}8\%$, für

$m_B = 0{,}108$ zu $\frac{0{,}108 - 0{,}108}{1{,}100 - 0{,}108} \cdot 100\% = 0{,}0\%$ und für

$m_B = 0{,}087$ zu $\frac{0{,}108 - 0{,}087}{1{,}100 - 0{,}087} \cdot 100\% = 2{,}1\%$

Der relative Fehler beträgt in diesem Fall 100%, der absolute Fehler ca. ± 1%.

Für die Kupplung der 12. Aminosäure wurden experimentell folgende Werte gefunden: $m_t = 0{,}66$ und $m_K = 0{,}16$. Für den Prozentsatz an nicht umgesetzten Aminogruppen bedeutet dies für die drei verschiedenen Blindwerte, für

$m_B = 0,100$ $\quad \frac{0,160 - 0,100}{0,660 - 0,100} \cdot 100\% = 10,7\%$, für

$m_B = 0,108$ $\quad \frac{0,160 - 0,108}{0,660 - 0,108} \cdot 100\% = 9,4\%$ und für

$m_B = 0,087$ $\quad \frac{0,160 - 0,087}{0,660 - 0,087} \cdot 100\% = 12,6\%$

Daraus ergibt sich ein absoluter Fehler von ca. ± 1,5%. Der relative Fehler beträgt jetzt nur noch ca. ± 15%. Berücksichtigt werden muss ausserdem der Titrationsfehler, der bei der potentiometrischen Bestimmung der Cl^--Ionen zwischen 0,5% und 1% liegt, so dass mit einem Gesamtfehler von ± 2% gerechnet werden muss. Beide Fehlerquellen lassen sich bei grösseren Ansätzen vermindern.
In modifizierter Form wurde diese Methode von K.Brunfeldt P.Roepstorff und J.Thomsen (21) zur Kontrolle der automatisierten Merrifieldsynthese herangezogen (22). Statt die Chloridionen zu bestimmen, wurden hier die freien Aminogruppen mit Perchlorsäure titriert und mit einer Glaselektrode bzw. kalomelelektrode bestimmt. Prinzipiell müssen hier dieselben Fehler berücksichtigt werden. Nur die von L.C.Dorman (8) beschriebene Methode kann zur Kontrolle der Umsätze bei der automatisierten Peptidsynthese verwendet werden. Der zusätzliche Zeitaufwand beträgt etwa zwei Stunden und steht in einem vernünftigen Verhältnis zur Dauer der Syntheseschritte.

b) Semiquantitative Ninhydrinmethode

Bei einer analytischen Kontrolle ist neben der Genauigkeit einer Methode auch der Zeitaufwand von Wichtigkeit. Die vorher angeführten Methoden (7,8) haben, abgesehen von der potentiometrischen Titration, alle den Nachteil, dass die Ergebnisse erst nach vielen Stunden vorliegen. Die Methode der potentiometrischen Titration hat den Nachteil, dass der Umsatz während der Kupplungsreaktion nicht bestimmt werden kann, da ja das gesamte Harz vorher

mehrmals mit verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen werden muss.
Daher ist es notwendig, neben den zeitraubenden, quantitativen Methoden auch eine Möglichkeit zu haben, zu entscheiden, ob die Kupplungsreaktion zum Stillstand gekommen oder möglicherweise bereits quantitativ abgelaufen ist.
Hierfür lässt sich die Ninhydrin-Reaktion (23) verwenden. Üblicherweise wird die Ninhydrin-Reaktion in wässriger Lösung durchgeführt. Will man aber die Reaktion am hydrophoben Harz durchführen, muss ein anderes Lösungsmittel verwendet werden. Hierzu hat sich Äthanol gut bewährt.
Soll die Methode brauchbar sein, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Es darf keine Abspaltung der Boc-Schutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen erfolgen.
2. Es soll keine Adsorption des Farbstoffs am Harz auftreten.
3. Die Reaktion muss empfindlich sein und quantitativ ablaufen.
4. Die Bestimmung soll schnell und einfach durchführbar sein.

Punkt 1 klärt folgendes Experiment: Eine Probe eines mit Boc-Alanin veresterten Harzes wurde mit Stein-Moore Reagens[+)] und Äthanol (1:1) eine Stunde lang auf 80°C erhitzt. Das Harz blieb unverändert weiss. Die Boc-Gruppe wurde also nicht abgespalten.
Um Punkt 2 zu klären, wurde folgendermassen vorgegangen: Mit Boc-Alanin verestertes Harz wurde 30 Minuten mit 1N HCl/Eisessig behandelt, in das Hydrochlorid überführt und mit Triäthylamin in Dimethylformamid wie üblich neutralisiert. Die freien Aminogruppen wurden mit Ninhydrin-

---

[+)] Benutzt wurde das zur Aminosäureanalyse üblicherweise verwendete Stein-Moore Reagens.

Reagens umgesetzt und die farbige Lösung abfiltriert. Nach zweimaligem Waschen mit Äthanol war der Farbstoff praktisch quantitativ aus dem Harz ausgewaschen. Somit lassen sich Eichkurven aufstellen, die eine kinetische Untersuchung der Kupplungsreaktion ermöglichen. Allerdings muss mit einem verhältnismässig grossen Wägefehler gerechnet werden, da sich das Harz nur schwer reproduzierbar trocknen lässt.

Zu Punkt 3: Die Ninhydrin-Reaktion auf freie Aminogruppen ist von sich aus schon sehr empfindlich. Die Empfindlichkeit liegt unter 10^{-6} Mol. Es bleibt die Frage noch offen, ob sich die Ninhydrin-Reaktion auf das heterogene Harz ubertragen lässt. Zuerst wurde untersucht, wie gross der Prozentsatz an freien Aminogruppen mindestens sein muss, um noch erfasst werden zu können. Zu diesen Untersuchungen wurde von einem mit Boc-Alanin veresterten Harz (0,16 meq./g) die Schutzgruppe abgespalten und die Aminogruppen mit Triäthylamin freigelegt. 2 mg dieses Harzes ergaben nach der Reaktion mit Ninhydrin eine noch erfassbare Färbung; d.h. es lassen sich $0{,}5 \cdot 10^{-6}$Mol freie Aminogruppen nachweisen. Während der Merrifieldsynthese müssen wenige Aminogruppen in Gegenwart von viel Harz nachgewiesen werden können. Um Fehler auszuschliessen, die sich durch Adsorption des Farbstoffs am Harz ergeben können, wurden Mischungen von Boc-Ala-Polymeremund H_2N-Ala-Polymerem mit abnehmendem Gehalt an freien Aminogruppen hergestellt. 50 mg jeder Mischung wurden mit Ninhydrin-Reagens in Äthanol 20 Minuten lang auf 80°C erwärmt, ohne dass das Harz aufgewirbelt wurde. Die so erhaltenen Farbabstufungen sind in Tab. 3 dargestellt.

Wendet man folgenden Kunstgriff an, lassen sich umständliche Trocken- und Wägeoperationen vermeiden. Während der Ninhydrin-Reaktion wird ein Aufwirbeln des Harzes verhindert (Reaktionstemperatur unter 80°C!). Wieviel mg Harz zur Bestimmung verwendet werden, spielt keine Rolle, da nur Farbschattierungen und keine absoluten Mengen an Farb-

stoff bestimmt werden. Die Färbung des Harzes hängt lediglich vom Gehalt an freien Aminogruppen ab; dieser ist von der Menge des Harzes unabhängig. Es genügen so 5 bis 10 mg Harz (in diesem Fall 0,5 bis 1 µMol Peptid), die während der Kupplungsreaktion entnommen werden. Die Durchführung der Ninhydrinreaktion ist im experimentellen Teil beschrieben und dauert 30 Minuten von der Probenahme bis zum Ergebnis. Ein Vergleich mit vorher hergestellten Eichproben gestattet es, den Gehalt der freien Aminogruppen auf ± 2% anzugeben. Somit ist auch Punkt 4 erfüllt.

% Boc-Ala-Polymer	70	80	90	92	94	96	98	100
% H_2N-Ala-Polymer	30	20	10	8	6	4	2	0
Färb.des Harzes	d.v.	st. v.	v.		s.v.		gr.	w.
Färb. der Lösung	sst. v.	st. v.	v.	s.v.	-	-	-	-

Tab. 3: Farbabstufungen bei der Reaktion von Harz mit verschiedenen Konzentrationen an freien Aminogruppen.
Abkürzungen: v. = violett; gr. = grau; w. = weiss; d. = dunkel; st. = stark; sst. = sehr stark; s. = schwach

Die Umsatzraten einer mit der semiquantitativen Ninhydrinmethode kontrollierten Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$ sind in Tab. 4 wiedergegeben. Aus ihr ergibt sich, dass die Kupplung mit zunehmender Kettenlänge schlechter verläuft. Die Erwartung, Boc-Leucin würde schlechter kuppeln als Boc-Alanin, wird hier bestätigt. Zweimaliges Umsetzen mit neuer Boc-Aminosäure bringt eine merkliche Verbesserung der Ausbeute, was auch von F.Weygand und R.Obermeier (6) bei der Synthese von Tetrapeptiden gefunden wurde. Eine dritte Umsetzung hingegen trägt nicht mehr wesentlich zur Steigerung des Umsatzes bei. Qualitativ dasselbe Ergebnis erhielt auch H.Hagenmaier (24) bei einer Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$, bei welcher der Syntheseverlauf nach der von L.C.Dorman (8) beschriebenen Methode kontrolliert wurde. Auch hier stell-

Aminosäuresequenz	Harz[a] ← Ala ← Leu ← Ala ← Leu ← Ala ← Leu ← Ala ← Leu ← Ala ← Leu ← Ala ← Leu ← Ala ←
Kupplungsschritt	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Freie Aminogruppen	
nach der ersten Kupplung[b]	5% >2% >2% >2% >2% >2% >2% [c] 3% 10% 10% 13%
nach der zweiten Kupplung[b]	5% >2% >2% >2% >2% >2% >2% 3% 10% 13%
nach der dritten Kupplung[b]	10%[d] 14%[d]
nach der ersten Acetylierung[e]	>2% >2% >2% >2% >2% >2% >2% 3% 2%[f] 4%[f] 14%[f]
nach der zweiten Acetylierung	>2%

Tab. 4: Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$ unter Kontrolle der semiquantitativen Ninhydrinmethode

a) 2,5 g chlormethyliertes Polystyrol (vernetzt mit 2% Divinylbenzol), Kapazität 1,3 mmol/g

b) 2,5 facher Überschuss an Boc-Aminosäure auf die erste Aminosäure bezogen, Reaktionszeit 2 Stunden

c) Reaktionszeit 30 Minuten

d) Reaktionszeit 12 Stunden

e) 1 Vol. Acetanhydrid, 2 Vol. 10% Triäthylamin in Dimethylformamid, Reaktionszeit 30 Minuten

f) 1 Vol. Acetanhydrid, 1 Vol. 10% Triäthylamin in Dimethylformamid, Reaktionszeit 30 Minuten

te sich heraus, dass durch Acetylieren nur ein Teil der nicht umgesetzten Aminogruppen blockiert wird. In einigen wenigen Fällen (25) wurde beobachtet, dass nach der Acetylierung mit Ninhydrin mehr Aminogruppen nachgewiesen werden konnten, als vorher. Neben unzureichender Blockierung freier Aminogruppen können also auch Nebenreaktionen ablaufen.

Eine dritte Umsetzung bringt keine wesentliche Ausbeuteverbesserung mehr. Das kann daran liegen, dass ein Teil der Aminogruppen auf Grund sterischer Hinderung an der Reaktion nicht mehr teilnehmen kann. Diese sterisch gehinderten Aminogruppen sind vielleicht auch der Acetylierung nicht mehr vollständig zugänglich. Wie bereits auf S.10 ausgeführt wurde, könnte ein Wechsel der Lösungsmittel zwischen den jeweiligen Arbeitsgängen eine Verbesserung der Ausbeute bringen.

Die Kupplung der Carboxylgruppen mit den freien Aminogruppen wird mit grösser werdender Peptidkette schlechter. Es könnte mit zunehmender Kettenlänge auch die Reaktion des Ninhydrins nicht mehr quantitativ verlaufen. Diese Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden (26), obwohl die Farbreaktion bei höherer Temperatur durchgeführt wird. Wird nur ein Teil der nicht umgesetzten Aminogruppen durch die Ninhydrin-Reaktion erfasst, so täuscht das einen besseren Umsatz vor. Er kann in Wirklichkeit schlechter sein, auf keinen Fall aber besser. Man erhält somit eine Information darüber, ob es sinnvoll ist, die Synthese fortzuführen, oder nicht. Die Möglichkeit, dass bei länger werdender Kettenlänge die Nachweisreaktion nicht mehr quantitativ abläuft, gilt aber grundsätzlich für alle Bestimmungsmethoden, die am Harz durchgeführt werden.

Diese Ergebnisse wurden an einem stark hydrophoben Peptid gewonnen (es enthielt keine sauren oder basischen Seitengruppen); sie dürfen nicht beliebig auf andere Sequenzen übertragen werden.

Neben dem Dodekapeptid $(Leu-Ala)_6$ wurde die Umsetzung von Boc-aminosäure-p-nitrophenylestern bei der Synthese der Partialsequenz 81 - 89 des Spermwal-Myoglobins untersucht: Boc-His(Bzl)-Glu(OH)-Ala-Glu(OH)-Leu-Lys(Cbo)-Pro-Leu-Ala. Das Hexapeptid Boc-Glu(OtBu)-Leu-Lys(Cbo)-Pro-Leu-Ala-Harz wurde nach der üblichen Merrifieldmethode aufgebaut: hierzu wurden 5 g Harz mit Boc-Alanin verestert, die Boc-Gruppe mit HCl/Eisessig abgespalten, neutralisiert mit 10% Triäthylamin in Dimethylformamid und zwei Mal umgesetzt mit einem drei- bis vierfachen Überschuss an Boc-aminosäure und Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI). Die Reaktionszeit betrug durchschnittlich zwei Stunden. Acetyliert wurde mit 40 ml Dimethylformamid und 5 ml Acetanhydrid in alkalischem Medium (3% Triäthylamin). Die nächsten drei Aminosäuren mussten nach der p-Nitropehylestermethode von M.Bodanszky (7,27,28) angefügt werden, da bei der HCl/Eisessigbehandlung die tertiäre Butylesterschutzgruppe des Boc-Glu(OtBu)-peptids mit abgespalten wird. Würde weiterhin mit Dicyclohexylcarbodiimid gekuppelt werden, so würde eine Kettenverzweigung erfolgen, da nun auch die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure aktiviert würde. Über die Darstellung der Boc-aminosäure-p-nitrophenylester wird im experimentellen Teil berichtet+). Die Kupplungsreaktionen der p-Nitrophenylester wurden mit der semiquantitativen Ninhydrinmethode kontrolliert, die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Es hat sich gezeigt, dass die p-Nitrophenylester schlechter kuppeln, als die mit DCCI aktivierten Aminosäuren. Dies wurde auch von R.B.Merrifield (2) gefunden. M.Bodanszky und J.T.Sheehan (29) versuchten, diese Ergebnisse am Beispiel der Synthese eines Tripeptids Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2

+) Herrn Doz.Dr.H.Hagenmaier danke ich für das Überlassen von t-Boc-Glutaminsäure-γ-tButylester (Boc-Glu(OtBu)OH) und dem entsprechenden p-Nitrophenylester (Boc-Glu(OtBu)-ONP).

zu widerlegen. Wie aus Tab. 4 ersichtlich ist, verlaufen bei der $(Leu\text{-}Ala)_6$ Synthese die ersten sechs Kupplungsschritte quantitativ, erst dann werden sie schlechter. Auch hier zeigt sich wieder, dass die Ergebnisse bei der Synthese kleiner Peptide nicht auf die Synthese grösserer Peptide übertragen werden können.

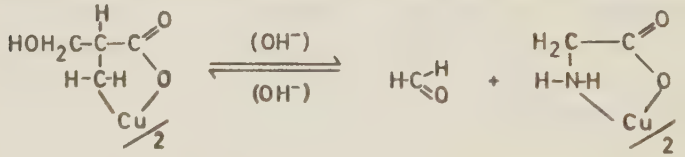
Boc-Ala-ONP --- H_2N-Glu(OH)-Leu-...-Harz			4 facher Überschuss
1.Kupplung	10 h	ca. 50%	freie Aminogruppen
2.Kupplung	13 h	ca. 20%	"
3.Kupplung	24 h	ca. 15%	"
1.Acetylierung[a)]		ca. 10%	"
2.Acetylierung[b)]		ca. 5%	"
Boc-Glu(OtBu)-ONP --- H_2N-Ala-Glu(OH)-...-Harz			
4 facher Überschuss (und 40 facher Überschuss an Imidazol)			
1.Kupplung	36 h	ca. 30%	freie Aminogruppen
2.Kupplung	72 h	ca. 10%	"
1.Acetylierung[b)]		ca. 10%	"
Boc-His(Bzl)-ONP[c)] --- H_2N-Glu(OH)-Ala-...-Harz			
1.Kupplung	48 h	ca. 40% fr. Aminogr.	10 facher Überschuss
2.Kupplung	48 h	ca. 30% "	6 facher Überschuss
Acetylierung ohne Erfolg			

Tab. 5: Ausbeuten der p-Nitrophenylestermethode bei der Synthese einer Partialsequenz (81 - 89) des Spermwal-Myoglobins. a) 40 ml DMF (mit 3% TEA) und 5 ml Acetanhydrid; b) 40 ml DMF (mit 3% TEA) und 10 ml Acetanhydrid; c) Der p-Nitrophenylester enthielt noch etwa 30% Ausgangsprodukt (Boc-His(Bzl)-OH).

Ein entscheidender Nachteil der aktivierten Ester liegt in den oft tagelangen Reaktionszeiten (30). Lange Reaktionszeiten geben Anlass zu Nebenreaktionen (s.S.8 ff.), hauptsächlich zur Racemisierung und zur Aminolyse von Esterbindungen. Daher wird von R.H.Mazur (30) vorgeschlagen, die Reaktionsgeschwindigkeit mit Imidazol zu beschleunigen. Es wird vermutet, dass ein reaktives Acylimidazol als Zwischenprodukt entsteht, das für den Mechanismus entscheidend ist.
Eine Verkürzung der Reaktionszeit konnte bei der Verwendung von p-Nitrophenylestern und gleichzeitig 40 fachem Überschuss an Imidazol, wie aus Tab. 5 hervorgeht, nicht festgestellt werden. Daher sollten bei der Merrifieldsynthese p-Nitrophenylester vermieden werden. Lediglich Boc-Asparagin und Boc-Glutamin sind als p-Nitrophenylester einzusetzen, da die Säureamidgruppe durch DCCI in das entsprechende Nitril überführt wird (31).
Wenn die säurelabile t-Butylesterschutzgruppe für die ω-Carboxylgruppe von Glutaminsäure und Asparaginsäure Verwendung finden soll, muss auf die von P.Sieber und B.Iselin (32) eingeführte 2-(p-Diphenyl)-isopropyl-oxycarbonyl-Schutzgruppe (Dpoc) zurückgegriffen werden. Diese lässt sich in Gegenwart von t-Butylestern und t-Butyläthern selektiv abspalten.

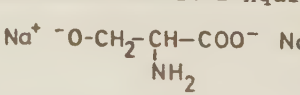
Diese Kombination ist vor allem bei der Synthese Serinhaltiger Peptide von Bedeutung. Die Hydroxylgruppe des Serins kann nicht direkt benzyliert werden (33,34). Im alkalischen Milieu, in dem Benzylierungen im allgemeinen durchgeführt werden, unterliegt Serin einer alkalischen Spaltungsreaktion in Formaldehyd und Glycin. Diese Reaktion ist die Umkehrung einer Aldoladdition. Sie unterliegt also einer alkalischen Katalyse, wobei zu beachten ist, dass der Formaldehyd entweichen kann.

Daher liegt das Gleichgewicht weit auf der rechten Seite:



Es wurde versucht, analog der pH-Stat-Methode von E.Schnabel (35) den Kupferkomplex des Serins mit Benzylbromid bzw. Benzylchlorid zu benzylieren, indem der pH-Wert langsam von pH 7 nach höheren pH-Werten verschoben wurde. Eine merkliche Reaktion setzte bis pH 11 nicht ein. Dann konnte ein geringer Verbrauch von Natronlauge festgestellt werden, der aber mit der Abscheidung von Kupfer-(1)-oxid einherging, was auf die Bildung von Formaldehyd schliessen lässt.

Serin sollte sich in flüssigem Ammoniak mit 2 Äquivalenten Natrium umsetzen lassen zu



das dann mit Benzylhalogenid zum Benzyläther-benzylester führen sollte. Vorversuche mit Propanol und Benzylbromid sind erfolgreich verlaufen. Somit sollte Serin in flüssigem Ammoniak mit zwei Äquivalenten Natrium reagieren. Im Versuch wurde ein Äquivalent Natrium sehr schnell aufgenommen (saures Proton der Carboxylgruppe). Dann allerdings erfolgte keine weitere Aufnahme von Natrium mehr, so dass auch dieser Versuch zu keinem positiven Ergebnis führte. Es verblieb nur der zeitraubende, umständliche Weg, aus synthetischem O-Benzyl-N-acetyl-D,L-serin (36,37,38) durch Racematspaltung mit Nierenacylase (39), O-Benzyl-L-Serin zu synthetisieren.

O-tButyl-L-serin hingegen lässt sich einfach aus L-Serin und Isobutylen herstellen (40,41) und würde so den Zeit-

aufwand zur Darstellung der Dpoc-aminosäurederivate rechtfertigen.

Mit Hilfe der Umsatzbestimmungen sollten sich nun die Werte der Aminosäureanalyse vorausberechnen lassen. Hierzu wurde ein $(Leu\text{-}Ala)_6$-Polymeres synthetisiert, welches dann in sechs weiteren Schritten zu einem $(Gly\text{-}Val)_3$-$(Leu\text{-}Ala)_6$ aufgebaut wurde. Die Umsatzkontrolle wurde gleichzeitig mit der Methode der potentiometrischen Titration und der semiquantitativen Ninhydrinmethode durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor peinlichst gereinigt (s. Exp.Teil). Zum Waschen wurden je 30 ml und zur Umsetzung je 20 ml verwendet. Die Kupplungen wurden mit relativ grossen Konzentrationen an Boc-aminosäuren ausgeführt, um hohe Ausbeuten zu erhalten. Nach der Synthese des $(Leu\text{-}Ala)_6$-Peptids wurde der Ansatz halbiert. Von der einen Hälfte wurde das Peptid mit HBr/Trifluoressigsäure abgespalten. Ein Teil des abgespaltenen Peptids wurde totalhydrolysiert und dann der Aminosäureanalyse unterworfen. Zur Bestimmung der Fehlsequenzen wurde der andere Teil des Peptids partialhydrolysiert (die Durchführung der Partialhydrolyse ist im experimentellen Teil beschrieben). Der Syntheseverlauf ist in Tab. 6 wiedergegeben. Bemerkenswert ist wieder der Abfall der freien Aminogruppen (m_t), die nach der HCl/Eisessigbehandlung potentiometrisch bestimmt wurden. Ab Aminosäure 11 blieb m_t praktisch konstant bis zum Schluss der Synthese. Ab Aminosäure 13 (Valin) blieben die Umsätze konstant, gleichgültig, ob Boc-Valin oder Boc-Glycin gekuppelt wurde. Die potentiometrische Titration ergab qualitativ dasselbe Resultat wie die Ninhydrinmethode, nur wurden nach der ersteren Methode ca. 80% Umsatz, nach der letzteren ca. 95% Umsatz festgestellt. Je nach Bestimmungsart errechnen sich dann verschiedene Verhältnisse für Ala/Val. Durch Vergleich mit dem tatsächlichen Ala/Val Verhältnis, das sich aus

		m_t +)	$m_t - m_B$	m_K	$m_K - m_B$	I	II	mMol Boc-Aminosäure
a)	1.Boc-Ala							
	2.Boc-Leu	2260	2160	100	0	0,0	0	11,3
	3.Boc-Ala	1700	1600	87	-	-	-	"
	4.Boc-Leu	1550	1450	104	4	0,2	-	"
	5.Boc-Ala	1560	1460	106	6	0,4	-	"
	6.Boc-Leu	1100	1000	108	8	0,8	1	"
	7.Boc-Ala	920	820	140	40	4,9	1	"
	8.Boc-Leu	960	860	125	25	2,9	2	"
	9.Boc-Ala	880	780	170	70	9,0	2	"
	10.Boc-Leu	740	640	145	45	7,0	3	"
	11.Boc-Ala	676	576	120	20	3,5	2	"
	12.Boc-Leu	663	563	162	62	11,0	5	3,3
b)	13.Boc-Val	657	557	232	132	23,0	10	4,0
	14.Boc-Gly	700	600	272	172	29,0	5	"
	15.Boc-Val	676	576	220	120	21,0	5	"
	16.Boc-Gly	650	550	210	110	20,0	6	"
	17.Boc-Val	720	620	220	120	19,0	3	"
	18.Boc-Gly	654	554	210	110	20,0	6	"

Tab. 6: Synthese von $(Gly\text{-}Val)_3$-$(Leu\text{-}Ala)_6$ nach der Merrifieldmethode. Die Umsatzkontrolle wurde mittels potentiometrischer Titration und Ninhydrin durchgeführt.

+) Angaben in µMol. a) Nach der Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$-Harz wurde der Ansatz im Verhältnis 3,5/6,5 geteilt.

b) geteilter Ansatz auf a) umgerechnet.

Abkürzungen: m_t = freie Aminogruppen nach der HCl/Eisessigbehandlung (durch pot.Titration der Chloridionen bestimmt); m_B = Blindwert, vor Beginn der Synthese zu 100 Mol bestimmt; m_K = freie Aminogruppen nach der Kupplung; I = % freie Aminogruppen nach der Methode der pot. Titration; II = % freie Aminogruppen nach der Ninhydrinmethode

der Aminosäureanalyse bestimmen lässt, kann festgestellt werden, welche der beiden Methoden das bessere Ergebnis liefert. Die Berechnungen wurden wie folgt durchgeführt und sind in den Tab. 7 und 8 zusammengefasst. Berechnet werden soll, wieviel Mol Leucin z.B. bei der 8. Kupplung (Boc-Leu) an die freien Aminogruppen ($m_t - m_B$) des Peptidharzes gebunden wurden. Diese Menge an gekuppeltem Leucin ist gegeben durch ($m_t - m_B$) - ($m_K - m_B$) = $m_t - m_K$ (Gl. 2). Die Summe aller dieser Werte für Leucin gibt die im Peptid vorhandene Menge Leucin an. Ebenso wurde bei Alanin, Valin und Glycin verfahren. Der Gehalt an Aminosäure 1 (Alanin) ergab sich aus der ersten HCl/Eisessigbehandlung und nachfolgenden potentiometrischen Titration. Dieser Wert entspricht gleichzeitig der Gesamtbeladung des Harzes an Aminosäure. Für die Berechnungen bei Anwendung der Ninhydrinmethode wurden von den $m_t - m_B$ Werten die µMol der freien Aminogruppen, die sich aus den Prozentzahlen berechnen lassen, abgezogen und so die Menge der gekuppelten Aminosäure berechnet.

	Aminosäure-analyse	potentiom. Titration	Ninhydrin-methode
Ala	63,3	6655	7390
Leu	51,5	5810	6470
Val	17,5	1376	1390
Gly	17,3	1312	1890

Tab. 7: Die bei der Hydrolyse von 17,5 mg Peptidharz durch die Aminosäureanalyse gefundenen Werte in µMol und die aus der potentiometrischen Titration und Ninhydrinmethode berechneten Mengen an Aminosäuren im gesamten Ansatz.

	Aminosäure-analyse	normiert auf Ala = 1	potentiom. Titration	Ninhydrin-methode
Ala	63,3	1,000	1,000	1,000
Leu	51,5	0,815	0,875	0,875
Val	17,5	0,276	0,206	0,262
Gly	17,3	0,273	0,197	0,256

Tab. 8: Die Werte der Tab. 7 wurden auf Ala = 1 normiert.

Zunächst ergibt sich eine völlige Übereinstimmung im Verhältnis Val/Gly; Valin und Glycin haben somit tatsächlich zu gleichen Prozentsätzen gekuppelt. Über die Höhe des Umsatzes gibt das Verhältnis Ala/Val Aufschluss:

Aminosäureanalyse:	Ala/Val = 3,6
potentiometrische Titration	Ala/Val = 6655/1376 = 4,8
Ninhydrinmethode	Ala/Val = 7390/1930 = 3,9

Es zeigt sich eindeutig, dass bei der potentiometrischen Titration schlechtere Umsätze gemessen wurden, als das tatsächlich der Fall war. Die Ninhydrinmethode lieferte genauere Werte, da sie empfindlicher ist, und somit bei kleineren Ansätzen - wie im vorliegenden Fall - eine genauere Erfassung der freien Aminogruppen zulässt.

Nach der Partialhydrolyse ergaben sich bei der gaschromatographischen Untersuchung folgende prozentuale Anteile an Dipeptiden:

Leu - Ala	62,2%
Ala - Leu	30,7%
Leu - Leu	6,7%
Ala - Ala	0,4%

c) Vergleichende Betrachtung der Bestimmungsmethoden

Die Vor- und Nachteile der massenspektroskopischen und photometrischen Methoden wurden schon früher behandelt und sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Methode	Zeitaufwand	Bemerkungen
Bestimmung der Phenylthiohydantoine durch die massenspektroskopische Verdünnungsanalyse (6)	6 h	nicht bei allen Aminosäuren anwendbar; sterische Hinderung ist möglich; nicht für Routineuntersuchungen
Bildung Schiffscher Basen mit Hydroxynaphtaldehyd (7)	12 h	gut geeignet für kinetische Untersuchungen; sterische Hinderung ist möglich; nicht für Routineuntersuchungen
Reaktion mit radioaktiver Verbindung	noch nicht beschrieben	Adsorption des radioaktiv markierten Reagenzes am Harz kann die Genauigkeit beeinflussen
Ninhydrin-Reaktion	5 bis 20 Minuten	semiquantitativ, sterische Hinderung möglich; kinetische Untersuchungen möglich
Potentiometrische Cl^-Titration (8)	1 h	kinetische Untersuchungen nicht möglich; besonders für grössere Ansätze geeignet
Aminosäureanalyse	24 h	Ergebnis nicht immer aussagekräftig
Optische Methoden (17,18,19)	10 Minuten	nur anwendbar, wenn bei der Reaktion eine farbige Gruppe frei wird

Tab. 9: Methoden zur Bestimmung freier Aminogruppen

Die Methode der potentiometrischen Titration und die semiquantitative Ninhydrinmethode haben beide vergleichbare Resultate gezeigt. Sie sind praktisch anwendbar, da sie keinen grossen - bei der Ninhydrinmethode nahezu keinen - Zeitaufwand benötigen. Es ist zweckmässig, beide Methoden zu benutzen, da sie sich gegenseitig ergänzen: Die Ninhydrinmethode ist eine direkte Methode, unterliegt somit wenig Fehlerquellen und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Da sie sich parallel zum Arbeitscyclus durchführen lässt, benötigt sie nur einen zusätzlichen Zeitaufwand von maximal fünf Minuten. Das Ergebnis liegt nach zwanzig Minuten vor. Die benötigte Menge Harz (2 bis 5 mg je Bestimmung) ist vernachlässigbar gering. Bei einem Ansatz von 5 g Harz liegt der Gesamtverbrauch für die Synthese eines Dodekapeptids unter 1%. Im Gegensatz zur Methode der potentiometrischen Titration können kinetische Untersuchungen vorgenommen werden, die praktisch keinen Zeitaufwand benötigen. Dadurch lässt sich die Kupplungszeit von Fall zu Fall auf ein Minimum reduzieren. Dies ist wichtig, denn freie Aminogruppen können unerwünschte Nebenreaktionen eingehen.

Die kritische Phase der Merrifieldsynthese beginnt mit der Freilegung der Aminogruppen und endet dann, wenn alle Aminogruppen mit der Boc-aminsäure reagiert haben, oder in ihr Hydrochlorid überführt worden sind (z.B. mit Pyridinhydrochlorid). In diesem Zeitraum wird das Harz oft mit Dimethylformamid gewaschen. Freie Aminogruppen können leicht Nebenreaktionen eingehen. Nach R.Uhmann (42) könnte der im Dimethylformamid vorhandene Formaldehyd mit den freien Aminogruppen Schiff'sche Basen bilden. Auch ist die Anwesenheit von Aminen nicht unbedenklich. Bei jedem Cyclus werden grosse Mengen Lösungsmittel verwendet, was schon bei geringen Verunreinigungen zu Komplikationen führen kann. Grösste Sorgfalt muss daher auf die Reinigung besonders des Dimethylformamid verwandt werden, denn bei

der Bestimmung der freien Aminogruppen durch die potentiometrische Titration der Chloridionen benötigt man besonders grosse Mengen Dimethylformamid. Ganz allgemein sollte mit Lösungsmitteln möglichst sparsam umgegangen werden.

d) Zur Strategie der Peptidsynthese

Die Synthese grösserer Peptide ist im Augenblick nur durch Fragmentkondensation möglich. Die dazu erforderlichen Partialsequenzen können nach der Festkörpermethode synthetisiert werden. Folgende Gesichtspunkte müssen beachtet werden:

Am Carboxylende der Pertialsequenzen soll nach Möglichkeit Glycin oder Prolin stehen; dann kann keine Racemisierung auftreten und alle Kupplungsmethoden stehen zur Verfügung. Steht Alanin am Carboxylende, kann nur die Azidkupplung (43) angewendet werden. Sie sollte mit guten Ausbeuten verlaufen, da kaum eine sterische Hinderung durch die Seitenkette zu erwarten ist.

Nach Glutaminsäure oder Asparaginsäure sollte die Sequenz möglichst rasch abgebrochen werden, da dann die Verwendung schlecht kuppelnder p-Nitrophenylester oder der wertvollen Dpoc-Derivate auf ein Mindestmass begrenzt werden kann.

Die Ermittlung der günstigsten Kombination von Partialsequenzen erfordert somit die Synthese sehr vieler kleiner Peptide. Bisher konnte nur das gereinigte Endprodukt Aufschluss darüber geben, ob die Synthese Erfolg hatte oder nicht. Leider lassen sich Partialsequenzen nur schwer rein darstellen, da Reinheitskriterien wie z.B. biologische Aktivität hier nicht in Betracht kommen. Man ist dann auf die Aminosäureanalyse angewiesen, die aber nur bei reinen Produkten aussagekräftig ist.
Chromatographische Methoden erfordern einen grossen Zeitaufwand und sind problematisch, da ein Gemisch vieler

ähnlicher Peptide vorliegt (s.Fig. 1). Ausserdem stösst man auf Löslichkeitsschwierigkeiten, da sich die geschützten Peptide nur in organischen Lösungsmitteln lösen lassen. Somit ist die Auswanl der Trägermaterialien stark eingeschränkt.
Diese zeitraubenden Arbeitsvorgänge sind nicht notwendig, da die Synthese nunmehr direkt kontrolliert werden kann. Eine Reinigung ist nur noch bei denjenigen Partialsequenzen erforderlich, die zur Synthese des endgültigen Peptids verwendet werden.
Mit Hilfe der "kontrollierten Merrifieldsynthese" sollten sich nun grössere Peptide aus einem Satz gut synthetisierbarer Partialsequenzen aufbauen lassen.

V. Verbesserte Synthese mehrfunktioneller geschützter Aminosäurederivate

Bei Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Thyrosin muss die ω-Funktion mit einer Schutzgruppe versehen werden, die unter den Bedingungen der Peptidsynthese stabil ist und nach der Synthese leicht wieder abgespalten werden kann. Neben der Tosylschutzgruppe (Tos-) für Lysin spielt die leichter abspaltbare Carbobenzoxy-(Cbo)-Schutzgruppe eine grosse Rolle. Die phenolische OH-Gruppe des Thyrosins wird durch Benzylierung geschützt. Die α-Aminogruppe wird einfach, durch Komplexbildung, mit Kupfer-(II)-ionen maskiert. Nachdem die Schutzgruppe eingeführt ist, wird der Kupferkomplex zerstört. Über die Zersetzung dieser Kupferkomplexe mit Salzsäure, Schwefelwasserstoff und Komplexbildnern wurde berichtet (44,45,46,47,48). Sie befriedigen alle nicht, da sie entweder sehr umständlich sind oder mit zu geringer Ausbeute verlaufen.
Das Ziel war, das Kupfer von den Kupferaminosäurekomplexen durch einen stärkeren Komplexbildner zu binden; der neu entstandene Komplex muss sich leicht vom Aminosäurederivat abtrennen lassen. Da die Kupferkomplexe von Aminosäuren in neutralem oder schwach alkalischem Medium unlöslich sind, wurde zuerst versucht, das Kupfer mittels des Natriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure (Titriplex III, E.Merck) in Suspension aus der Komplexbindung mit der Aminosäure zu entfernen, was bei $(Tos\text{-}Lys)_2Cu$ verhältnismässig gut gelang, bei den anderen Komplexen aber auf Grund ihrer Stabilität versagte. Ganz allgemein lassen sich die Kupferkomplexe in saurem Bereich, unterhalb pH 4, mit Säuren zersetzen. In stark alkalischem Bereich sind sie auch nicht stabil, aber hier muss mit Racemisierung gerechnet werden.
Die Verwendung von Titriplex III vereinfacht die Aufarbeitung wesentlich. Der Kupferkomplex des Aminosäurederi-

vats wurde mit konzentrierter Salzsäure zersetzt, Titriplex III zugegeben und neutralisiert. Während der Neutralisation fiel die geschützte Aminosäure aus. Das Kupfer wurde durch Titriplex III in Lösung gehalten und konnte durch einfaches Filtrieren entfernt werden. Einmaliges Umkristallisieren führte in den meisten Fällen in hohen Ausbeuten zu reinen Produkten. Besonders vorteilhaft zeigte sich diese Methode bei der Darstellung von N^{ε}-Cbo-Lysin. Beim Neutralisieren der stark sauren Lösung mit festem Natriumhydroxid wurde so viel Wärme frei, dass sich das N^{ε}-Cbo-Lysin im heissen Wasser löste. Beim Abkühlen kristallisierte in leicht filtrierbarer Form sehr reines N^{ε}-Cbo-Lysin aus.

Untersucht wurden die Kupferkomplexe von N^{ε}-Tos-Lysin, N^{ε}-Cbo-Lysin, O-Bzl-Tyrosin und Tos-Arginin. Die Darstellung von Tos-Arginin nach dieser Methode ist nicht gelungen (49), da sowohl der Kupferkomplex des Tos-Arginins als auch das Tos-Arginin selbst wasserlöslich ist.

Die freie Äthylendiamintetraessigsäure ist bei pH 3 bis 4 schwer löslich. In diesem Bereich ist auch ihr Kupferkomplex nicht stabil. Bei tieferem pH löst sie sich als Hydrochlorid und in schwach alkalischem Bereich als Alkalisalz auf. Auf diese Weise könnte die Äthylendiamintetraessigsäure bei pH 3 bis 4 leicht vom Kupfer abgetrennt und zurückgewonnen werden. Sowohl das Kupfer als auch die Äthylendiamintetraessigsäure könnten wieder verwendet werden, was eine technische Verwendung dieser Methode möglich erscheinen lässt.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Die Durchführung der Merrifieldsynthese

1.) Reaktionsgefässe

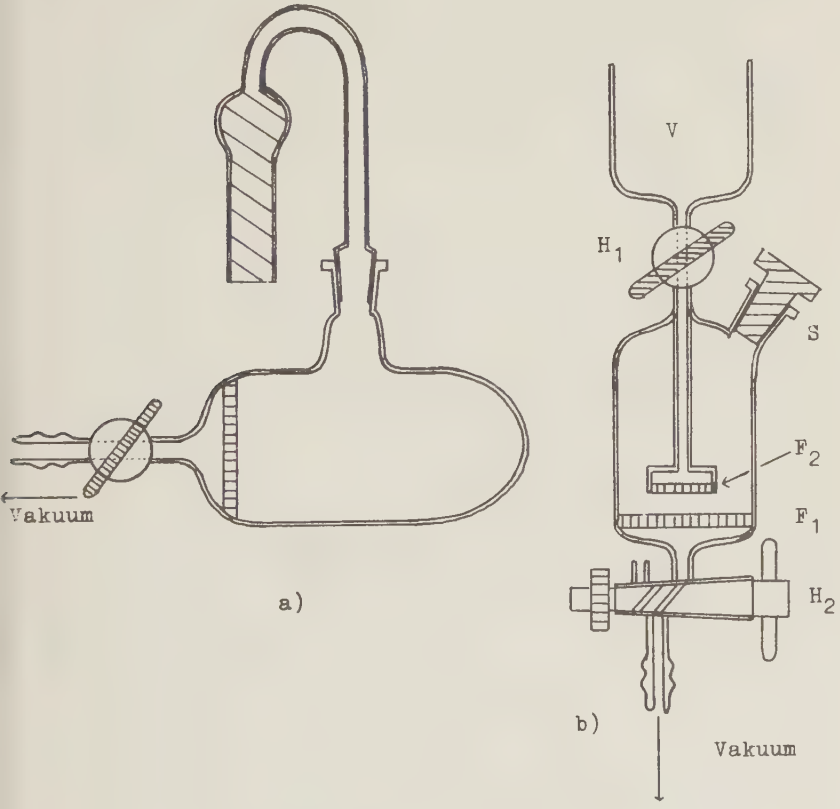


Fig. 4: Reaktionsgefässe zur Durchführung der Merrifield-synthese

Zuerst wurde das in Fig. 4a dargestellte Reaktionsgefäss verwendet. Während der Reaktion wurde am oberen Rand und im Tubus Harz angeschwemmt, welches von den Lösungsmitteln und Reagentien nicht genügend bespült wurde. Durch Neigen um die in Fig. 4a eingezeichnete Achse liess sich das Harz während der Reaktion in Suspension halten. Zum Abfiltrieren musste das Gefäss zusammen mit der Halterung senkrecht gestellt werden. Da die Abspaltung des Peptids in diesem Gefäss nicht durchgeführt werden konnte, musste das Peptid-Harz in einen Rundkolben uberführt werden.

Diese Nachteile konnten durch die in Fig. 4b dargestellte Apparatur vermieden werden. Geschüttelt wurde durch Hin- und Herbewegen in der horizontalen Ebene. Während der ganzen Synthese blieb das Gefäss geschlossen. Lösungsmittel und verbrauchte Reagentien liessen sich durch Anlegen eines Vakuums über die Fritte F_1 absaugen. Dabei entstand im Reaktionsgefäss ein Unterdruck, durch den sich das im oberen Teil V befindende, frische Lösungsmittel in das Reaktionsgefäss befördern liess, nachdem der Hahn 1 geöffnet und Hahn 2 geschlossen worden war. Da während der ganzen Synthese das Gefäss geschlossen blieb, wurde der ganze Innenraum, im Gegensatz zu dem in Fig. 4a abgebildeten Gefäss, vom Lösungsmittel bespült. Die Fritte F_2 verhinderte ein Eindringen des Harzes in den Zulaufstutzen. Das Speichergefäss V wurde wie ein Zylinder geeicht. Somit konnte bereits frisches Lösungsmittel in der gewünschten Menge in das Speichergefäss gefüllt werden, während noch über den Hahn 2 das verbrauchte Lösungsmittel abgesaugt wurde. Anschliessend an die Peptidsynthese konnte auch die Abspaltung vom Harz direkt in dem Gefäss durchgeführt werden. Somit wurde der Zeitaufwand zur Bedienung der Apparatur auf ein Minimum beschränkt.

2.) Veresterung des Harzes mit der ersten Boc-Aminosäure

Die Veresterung wurde nach der Vorschrift von R.B.Merrifield (2) durchgeführt: Chlormethyliertes Polystyrol, das mit 2% Divinylbenzol vernetzt war, wurde mit der doppelten Menge Boc-Aminosäure und Triäthylamin (bezogen auf die Chlormethylgruppen) 24 bis 48 Stunden in absolutem Äthanol unter Rühren am Rückfluss erhitzt. Anschliessend wurden die kleinen Harzpartikel durch Sedimentation in Äthanol entfernt.

3.) Peptidsynthese

Das mit der ersten Boc-Aminosäure veresterte Harz wurde nacheinander mit Dimethylformamid und Methylenchlorid je dreimal gewaschen. Zur Bestimmung des Blindwertes m_B wurde das Harz mit einer 0,3 molaren Lösung von Pyridinhydrochlorid+) in Methylenchlorid geschüttelt und der Chloridgehalt wie unten beschrieben bestimmt. Dann erfolgte die Synthese nach dem in Tab. 10 angegebenen Syntheseplan.

Zur Durchführung der Chloridbestimmung wurden die in Tab. 10 mit einer Klammer gekennzeichneten Filtrate vereinigt, mit 20 ml 2N HNO_3 angesäuert und mit 0,1N $AgNO_3$ potentiometrisch bestimmt (Präzisions Potentiometer 353 Metrohm). Die Berechnung des Umsatzes ist unter IVa) Gl.1 beschrieben.

4.) Durchführung der semiquantitativen Ninhydrinmethode

Am Ende bzw. während der Kupplungsreaktion, wurden 5 bis 10 mg (ca. 0,5 bis 1 μMol Peptid bei einer Beladung von 0,16 meq. Aminosäure/ g Harz) aus dem Reaktionsgefäss entnommen und in ein Glührörchen überführt. Dann wurde

---

+) Fluka AG., Buchs, Schweiz

Boc-Aminosäure-Harz
↓
2x Äthanol
3x DMF
3x Methylenchlorid ⟶ Bestimmung des Blindwerts
2x Äthanol
3x Essigsäure
1x 1N HCl/Eisessig 30 Minuten ⟵
3x Essigsäure
2x Äthanol
nx DMF bis Cl^- negativ
2x DMF/TEA[a] je 15 Minuten } ⟶ pot. Titration
nx DMF bis Cl^- negativ } ⟶ der Cl^- Ionen
3x Methylenchlorid
Kupplung (Boc-Aminos. + DCCI in Methylenchlorid
3x Methylenchlorid
1x Pyridinhydrochlorid in Methylenchlorid 15 Minuten
2x Methylenchlorid
nx DMF bis Cl^- negativ
2x DMF/TEA[a] } ⟶ pot. Titration
nx DMF bis Cl^- negativ } ⟶ der Cl^- Ionen
2x Äthanol ⟶ semiquantitative Ninhydrinmethode
3x Essigsäure ⟵
↓
3x Trifluoressigsäure
1x HBr/Trifluoressigsäure 15 bis 30 Minuten } ⟶ in Äther
3x Trifluoressigsäure
↓
Peptid

Tab. 10: Arbeitsschema für die Durchführung der Merrifieldsynthese. a) 10% Triäthylamin in Dimethylformamid; b) 0,3M Pyridinhydrochlorid in Methylenchlorid.

zweimal mit Äthanol aufgeschlämmt und dekantiert, 0,5 ml Stein-Moore Reagens zugesetzt und mit 0,5 ml Äthanol verdünnt. Nachdem das Harz sedimentiert war, wurde 20 Minuten auf 75°C erwärmt, wobei sich das Harz je nach Gehalt an freien Aminogruppen mehr oder weniger stark anfärbte. Ist die Violettfärbung zu stark, dann kann die Kupplung so lange wiederholt werden, bis keine Verbesserung der Umsetzung mehr erfolgt.
Will man die Kupplung dagegen nur einmal durchführen, wird nach der Kupplungsreaktion wie üblich verfahren (s.Tab. 10), bis zu der Stelle im Arbeitsschema, an der das Harz mit Äthanol gewaschen wird. Nachdem das Äthanol abgesaugt ist, wird die zur Bestimmung benötigte Probemenge des Harzes entnommen. Die Farbreaktion selbst wird gleichzeitig mit der Abspaltung der Schutzgruppe durchgeführt. In diesem Fall benötigt die Kontrollmethode praktisch keinen zusätzlichen Zeitaufwand.

5.) Abspalten des Peptids vom Harz

a) mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure: Der Stopfen S der Apparatur (Fig. 4b) wurde durch einen Schliffkern mit Hahn ersetzt, der beim Einleiten von HBr-Gas geöffnet und bei den Waschvorgängen geschlossen wurde. Nach der letzten Kupplung wurde das Harz mit Methylenchlorid, Äthanol, Eisessig und Trifluoressigsäure je dreimal gewaschen und mit 10 bis 30 ml Trifluoressigsäure versetzt. In einer vorgeschalteten Waschflasche mit einer Lösung von ca. 5 g Resorcin in 20 ml Trifluoressigsäure wurde das HBr-Gas von Brom befreit. Zuerst wurde das Gas über den Hahn H_2 direkt in den Abzug geleitet, bis alle Luft in den Zuleitungen verdrängt war. Dann wurde Hahn H_2 so geschaltet, dass das Gas in das Reaktionsgefäss geleitet wurde, und gleichzeitig der Hahn am seitlichen Tubus geöffnet. Während das Gas durch die Suspension perlte, wurde die Apparatur langsam geschüttelt. Nach 10 Minuten waren ca. 80% des Peptids ab-

gespalten und nach 90 Minuten war die Abspaltung praktisch vollständig abgelaufen. Die Trifluoressigsäure wurde danach abgesaugt und das Harz noch dreimal mit kleinen Portionen Trifluoressigsäure nachgewaschen. Beim Eingiessen der vereinigten Filtrate in wasserfreien Äther fiel das Peptid flockig aus und wurde abzentrifugiert. Durch wiederholtes Aufschlämmen und Zentrifugieren liess sich das Peptid von Trifluoressigsäure und Bromwasserstoff befreien.
Das Peptid wurde abfiltriert und in der Trockenpistole 5 Stunden bei 40°C im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

b) mit Hydrazin: Nach der Kupplung wurde das Harz mit Methylenchlorid, Dimethylformamid, Äthanol und Dimethylformamid je dreimal gewaschen, in 20 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 0,5 bis 2 ml Hydrazinhydrat oder wasserfreiem Hydrazin (50) mehrere Tage geschüttelt (51). Dann wurde abgesaugt und mehrmals mit wenig Dimethylformamid gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Hochvakuum zu einem zähen Öl eingeengt und aus Wasser/Methanol kristallisiert.

II. Synthese der Peptide

1.) Synthese von $(Leu\text{-}Ala)_6$

2,5 g chlormethyliertes Harz mit einer Kapazität von 1,3 meq./g wurden mit 605 mg (3,2 mMol) Boc-Alanin und 500 mg (5 mMol) Triäthylamin in 20 ml absolutem Äthanol 40 Stunden bei 80°C verestert. Die Synthese wurde mit der semiquantitativen Ninhydrinmethode kontrolliert und ist in Tab. 4 dargestellt. Abgespalten wurde das Peptid mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure und nach Vorschrift I, 5a aufgearbeitet. Die Rohausbeute an Peptid betrug 436 mg Peptid.

2.) Synthese von $(Gly\text{-}Val)_3\text{-}(Leu\text{-}Ala)_6$

10 g chlormethyliertes Harz mit einer Kapazität von etwa 1,2 meq./g wurde mit 2 g (10 mMol) Boc-Alanin und 1 g Tri-

äthylamin 24 Stunden bei 75°C in absolutem Äthanol umgesetzt. Verwendet wurden 5g des mit 2,1 mMol Boc-Alanin beladenen Harzes[+]. Die Synthese wurde gleichzeitig mit der Methode der potentiometrischen Titration (8) und der semiquantitativen Ninhydrinmethode kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst.
Als Blindwert m_B wurde ein Verbrauch von 1 ml 0,1N $AgNO_3$-Lösung festgestellt. Nach der 11. Kupplung (Boc-Leu ——→ H_2N - Ala-....-Harz) wurde der Ansatz im Verhältnis 3,5:6,5 geteilt. Von einem Teil des Peptidharzes konnten mit HBr/Trifluoressigsäure 150 mg $(Leu-Ala)_6$-Peptid abgespalten werden. Der andere Teil wurde zu $(Gly-Val)_3$-$(Leu-Ala)_6$-Harz aufgebaut. Die HBr/Trifluoressigsäurebehandlung ergab 200 mg Peptid.

3.) Synthese der Partialsequenz 81 bis 89 des Spermwal Myoglobins

Synthetisiert wurde das Nonapeptid folgender Sequenz: Boc-His(Bzl)-Glu(OH)-Ala-Glu(OH)-Leu-Lys(Cbo)-Pro-Leu-Ala-N_2H_3. Hierzu wurden 5 g chlormethylierte Bio Beads (Bio Rad, S.X-2, 200 - 400 Mesh, capacity 0,7 meq./gm Control Number 5413) mit 3,3 g (17,5 mMol) Boc-Alanin und 1,75 g (17,5 mMol) Triäthylamin in 40 ml absolutem Äthanol 48 Stunden lang bei 80°C umgesetzt. Die Beladung an Boc-Alanin wurde zu 1,07 bestimmt, in dem eine genau gewogene Menge des mit Boc-Alanin veresterten Harzes mit einer gesättigten Lösung von HBr in Trifluoressigsäure 90 Minuten gerührt wurde. Danach wurde filtriert, die Trifluoressigsäure abgezogen und der Gehalt an Aminosäure im Aminosäureanalysator bestimmt.
Die freien Aminogruppen nach der HCl/Eisessigbehandlung

[+]) Herrn Doz.Dr.H.Hagenmaier danke ich für Überlassen von 15 g chlormethyliertem Polystyrol (2% Divinylbenzol); die Chlormethylierung wurde in n-Hexan durchgeführt.

wurden nach Volhard (52) bestimmt. Sie fielen nach der ersten Kupplung von 1,07 auf 0,6 mMol ab, um dann konstant zu bleiben. Bis zur 8. Aminosäure wurde zweimal mit je vierfachem Überschuss umgesetzt. Über die Reaktionszeiten, Überschuss an Boc-Komponente und Ausbeute bei den Kupplungen der p-Nitrophenylester gibt Tab. 5 Auskunft. Abgespalten wurde das Peptid nach Vorschrift I, 5b mit 1 ml wasserfreiem Hydrazin (50) in 20 ml Dimethylformamid. Die Reaktionszeit betrug 2 Tage. Das zunächst anfallende zähe Öl konnte durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol/Wasser kristallin erhalten werden. Ausbeute: ca. 50 mg Peptid.

III. Durchführung der Aminosäureanalysen

10 bis 100 mg getrocknetes Peptid wurden in eine dickwandige Glasampulle genau eingewogen, mit ca. 10 ml 6N HCl versetzt und abgeschmolzen. Die Hydrolysendauer betrug zwischen 12 Stunden und 3 Tagen, je nach der Hydrolysierbarkeit der Substanz. Dann wurde das Hydrolysat i.v. zur Trokkene eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen und nochmals eingedampft. Der Rückstand wurde in einer definierten Menge Puffer aufgenommen und ein aliquoter Teil zur Aminosäureanalyse[+] verwendet.

Aminosäureanalyse von Peptid II,1 $(Leu\text{-}Ala)_6$:
Einwaage: 10,3 mg = 8,6 µMol
Hydrolysebedingungen: 6N HCl, 60 Stunden bei 110°C
Gefunden: Ala 38,6 µMol
Leu 40,5 µMol

Aminosäureanalyse von Peptid II, 2 $(Gly\text{-}Val)_3$-$(Leu\text{-}Ala)_6$:
$(Leu\text{-}Ala)_6$ Einwaage: 31 mg = 146 µMol
Hydrolysebedingungen: 6N HCl, 72h bei 110°C

[+]) Herrn H.Bartholomä danke ich für die Durchführung und Auswertung vieler Aminosäureanalysen.

Gefunden: Leu 93,6 µMol
Ala 115,2 µMol

$(Gly\text{-}Val)_3\text{-}(Leu\text{-}Ala)_6$ Einwaage: 17,5 mg = 11,8 µMol
Hydrolysebedingungen: 6N HCl, 72 Stunden bei 110°C
Gefunden: Ala 63,3 µMol
Leu 51,5 µMol
Val 17,5 µMol
Gly 17,3 µMol

IV. Untersuchungen zur Aminolyse der Peptidesterbindung

5 g Harz (s.II,2), das mit 2 mMol Boc-Alanin verestert worden war, wurden wie unter I,3 (s.Tab. 10) beschrieben mit 2,4 g (10 mMol) Boc-Leucin-hemihydrat zum entsprechenden Dipeptidharz umgesetzt. Nach der Abspaltung der Boc-Gruppe wurde mit Dimethylformamid/Triäthylamin (10%) neutralisiert und in Methylenchlorid bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 32 Stunden bzw. 7 Tagen wurde abfiltriert, mit Methylenchlorid, Dimethylformamid und Äthanol gewaschen. Das Filtrat wurde mit 1 ml konzentrierter Salzsäure angesäuert und die Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Pufferlösung aufgenommen und im Aminosäureanalysator analysiert. Ergebnisse und Diskussion s.S.8.

Das Harz wurde mit HBr/Trifluoressigsäure behandelt und, wie unter V beschrieben, gaschromatographisch und massenspektroskopisch auf Dipeptide und Tetrapeptide untersucht. Es konnte nur Leu-Ala definitiv nachgewiesen werden.

V. Partialhydrolysen und GC/MS Untersuchungen

Die Partialhydrolysen wurden mit 50 bis 100 mg Peptid in 37% iger Salzsäure im allgemeinen 4 Tage bei 37°C unter Lichtausschluss durchgeführt. Anschliessend wurde die Salzsäure quantitativ im Vakuum abgezogen und der Rückstand in absolutem Methanol aufgenommen.

a) Veresterung: Verestert wurde mit Diazomethan, das vor der Reaktion im Vakuum in eine mit Aceton/Trockeneis gekühlte Kühlfalle destilliert wurde (etwas Äther vorlegen!). Die Reaktion wurde als beendet betrachtet, wenn die Lösung von Peptid und Diazomethan länger als 1 Minute gelb gefärbt blieb.

b) Trifluoracetylierung: Mit Trifluoressigsäure/Trifluoressigsäureanhydrid. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in wenig Trifluoressigsäure (5 ml) mit 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid 14 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurden die Lösungsmittel abgezogen und zurück blieb ein Öl, das zwischen Essigester und Wasser verteilt wurde. Die organische Phase wurde mit einer Natriumhydrogenkarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nun wurde entweder direkt oder nach Abziehen der Lösungsmittel die Gaschromatogramme bzw. die Massenspektren aufgenommen.
Mit Trifluoressigsäuremethylester. Die methanolische Lösung des Peptids wird mit 0,5 ml Trifluoressigsäuremethylester versetzt und mit Triäthylamin auf pH 7 bis 8 eingestellt. Der pH Wert wurde mehrmals kontrolliert und eventuell korrigiert. Die Trifluoracetylierung war nach einigen Stunden beendet.
Ein typisches Gaschromatogramm zeigt Fig. 5.

Ergebnisse:
Peptid II, 1 $(Leu\text{-}Ala)_6$ s.Tab. 1.
Peptid II, 2 $(Leu\text{-}Ala)_6$ s.auch Fig. 5.

TFA-Ala-Ala-OMe	0,4%
TFA-Leu-Ala-OMe	62,2%
TFA-Ala-Leu-OMe	30,7%
TFA-Leu-Leu-OMe	6,7%

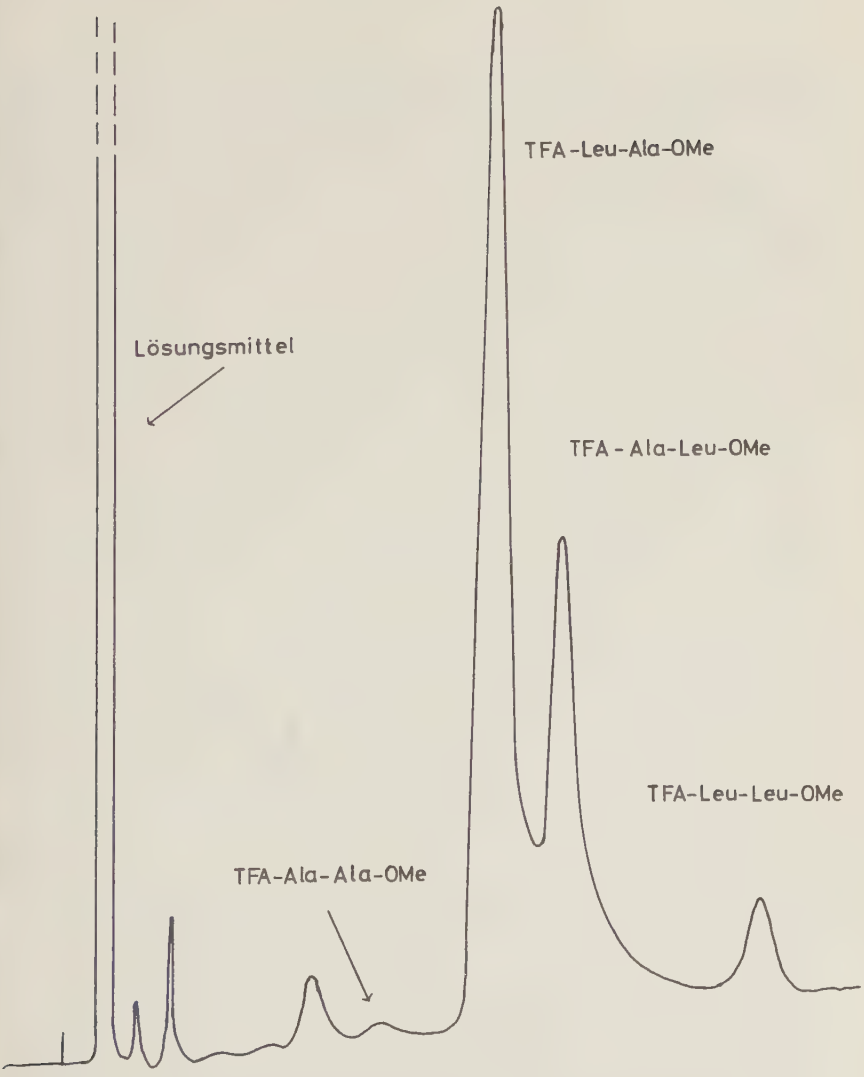


Fig. 5: Gaschromatogramm des Partialhydrolysats von II,2 $(Leu\text{-}Ala)_6$. Gas Chromatograph-Mass Spectrometer LKB 9000; Säule: Chromosorb mit 10% OV 17; isotherm Temp.: 200°C .

VI. Darstellung der Aminosäurederivate

1. Aminosäurederivate mehrfunktioneller Aminosäuren

Die unter 1.1 bis 1.4 beschriebenen Derivate wurden nach der Kupferkomplexmethode dargestellt.
Allgemeine Arbeitsvorschrift: Die Darstellungen der Kupferkomplexe sind beschrieben und werden bei den einzelnen Derivaten gesondert angegeben. Hier soll nur die Zersetzung der Kupferkomplexe von Aminosäurederivaten behandelt werden.

a) alkalische Aufarbeitung: 0,025 Mol des entsprechenden Komplexes wurden in 200 ml 1N NaOH suspendiert und mit 20 g (0,05 Mol) Titriplex III in 200 ml Wasser gelöst versetzt und bis zur vollständigen Auflösung des Komplexes gerührt (ca. 30 Minuten). Dann wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7 gebracht, der Niederschlag nach einer Stunde abgesaugt und aus Wasser oder Eisessig umkristallisiert.

b) saure Aufarbeitung: 6,3 g Kupferkomplex wurden mit 12 g Titriplex III in 200 ml Wasser suspendiert. Dann wurde langsam konzentrierte Salzsäure zugegeben, bis sich auf einen geringen Rest alles zu einer grünen Lösung aufgelöst hatte. Nach dem Filtrieren wurde mit festem Natriumhydroxid neutralisiert (heftige Erwärmung!). Beim Erkalten kristallisierte die Aminosäure direkt aus.

1.1 N^{ε}-p-Tos-Lys-OH (MG 300)
Nach der Vorschrift von V.Du Vigneaud et al. (53) wurden aus 24 g L-Lysinhydrochlorid 31 g des luftgetrockneten Kupferkomplexes des Tos-Lysins erhalten. Ausbeute: 71%. 17,5 g (0,026 Mol) wurden nach VI,1a aufgearbeitet. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 18 g mit einem Schmelzpunkt von 223°C. Nach Umkristallisieren aus Eisessig konnten 14 g Tos-Lysin mit einem Schmelzpunkt von 233°C erhalten werden (Lit.: 237°C). Ausbeute: 92%.

Analyse:					
	ber.	C 52,00	H 6,66	N 9,33	S 10,66
	gef.	51,98	6,75	9,11	10,25

1.2 N^{ε}-p-Tos-Lys-OMe·HCl (54) (MG 350)

14 g N^{ε}-p-Tos-Lys-OH wurden in 400 ml absolutem Methanol gelöst, mit einer Eis/Kochsalz Kältemischung gekühlt und mit HCl-Gas gesättigt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, das Lösungsmittel i.v. abgezogen und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute: 13 g (80%) Fp.: 133°C (Lit.).: 137°C

Analyse:	ber.	C	48,00	H	6,67	N	8,00	S 9,15	Cl 10,00
	gef.		47,79		6,90		7,89	8,93	10,37

1.3 N^{ε}-Cbo-Lys-OH (MG 266)

Nach der Vorschrift von K.Schlögel und H.Fabitschowitz (55) wurden aus 12 g (0,065 Mol) Lysinhydrochlorid mit einer Ausbeute von 62% 15 g des Kupferkomplexes von N^{ε}-Cbo-Lys erhalten. Analyse für $(C_{13}H_{17}O_4N_2)_2Cu$ (MG 594)

ber.	C	52,50	H	5,71	H	9,38	Cu 10,75
gef.		51,96		6,05		8,63	9,22

6,3 g dieses Kupferkomplexes wurden nach VI,1b sauer aufgearbeitet. Zu dem Komplex wurden 12 g Titriplex III gegeben. Nachdem die neutralisierte Lösung abgekühlt war, kristallisierte reines Cbo-Lysin aus.

Ausbeute: 4 g (71%) Fp.: 254°C (Lit.: 255°C)

Analyse:	ber.	C	58,71	H	6,79	N 10,58
	gef.		58,56		7,08	9,79

In einem grösseren Ansatz von 240 g Lysinhydrochlorid konnten nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser 270 g N^{ε}-Cbo-Lysin erhalten werden. Ausbeute: 78% Fp.: 253°C

1.4 O-Bzl-Tyr-OH (MG 271)

Der Kupferkomplex wurde nach der Vorschrift von E.Wünsch et al. (45) dargestellt. Aus 14,5 g Tyrosin konnten 17 g des Kupferkomplexes erhalten werden.

3,3 g (0,006 Mol) dieses Benzyl-tyrosin-kupferkomplexes wurden nach VI,1b sauer aufgearbeitet, wobei nach der Zugabe von Salzsäure statt einer grünen Lösung nur eine grüne Suspension erhalten wurde, was die Aufarbeitung aber

nicht nachteilig beeinflusste. Die Ausbeute betrug nach einmaligem Umkristallisieren aus 80% iger Essigsäure 2,2 g (75%) mit einem Schmelzpunkt von 235°C (Lit.: 223°C). Jedes weitere Umkristallisieren führte zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes um etwa 5°C; gleichzeitig verschlechterten sich die Elementaranalysen.

Analyse:	ber.	C 70,83	H 6,32	N 5,16
	gef.	70,32	6,31	4,92

1.5 O-Bzl-L-Serin (MG 192)

1.51 α,ß-Dibrom-propionsäure-äthylester

200 g (2 Mol) Acrylsäureäthylester wurden in 200 ml trockenem Äther gelöst, mit 120 ml Brom tropfenweise unter Rühren versetzt (Temp. < 5°C) und über Nacht stehen gelassen. Das Lösungsmittel und überschüssiges Brom wurde abgezogen und der Rückstand i.v. über eine 15 cm lange Vigreuxkolonne destilliert. Kp.$_{15}$ 120°C, Ausbeute quantitativ.

1.52 O-Bzl-D,L-Serin (36)

Zu 520 g α,ß-Dibrom-propionsäure-äthylester wurden unter Rühren bei 0°C innerhalb von 4 Stunden eine Lösung von 46 g Natrium in 1 Liter Benzylalkohol zugetropft und eine Stunde gerührt. Der Ester wurde unter vorsichtiger Zugabe von 440 ml 5N NaOH verseift (Rühren, Eiskühlung), eine Stunde gerührt und dann mit 3 Liter Äther geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, die Ätherlösungen 4 mal mit je 200 ml Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen unter Kühlen mit ca. 440 ml 5N H_2SO_4 angesäuert (pH 2). Das abgeschiedene Öl wurde in 800 ml Äther aufgenommen, die wässrige Phase 2 mal mit Äther extrahiert. Die gesammelten Ätherextrakte wurden säurefreigewaschen und kurz mit $CaCl_2$ getrocknet.

DerÄther wurde entfernt, das zurückbleibende Öl mit 5 Liter konzentriertem Ammonikwasser versetzt und 8 bis 10 Tage NH_3 durchgeleitet. Die Lösung wurde filtriert und zu einem Brei konzentriert, der Rückstand mit Äther verrieben und abge-

nutscht. Das Gemisch von O-Bzl-D,L-Serin und Ammoniumbromid wurde mit 6 Liter kochendem Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 220 bis 240 g (57 bis 62%); Fp.: 218°C.

1.53 N-Ac-O-Bzl-D,L-Serin (38)
150 ml Acetanhydrid und 980 ml 2N NaOH wurden gleichzeitig zu einer gekühlten Lösung von 198 g O-Bzl-D,L-Serin in 498 ml 2N NaOH gegeben und sofort mit 1N HCl auf pH 2 gebracht. Nach kurzer Zeit kristallisierte das N-Acetylderivat aus, das nach einer Stunde abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen wurde. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser konnte in 80% Ausbeute reines N-Acetyl-O-benzyl-D,L-serin erhalten werden. Fp.: 139 - 140°C.

1.54 O-Bzl-L-Serin
Die zur Racematspaltung erforderliche Acylase I wurde nach J.P.Greenstein et al. (56) aus Schweinenieren isoliert. Zur Racematspaltung wurden 50 g N-Ac-O-Bzl-D,L-Serin in 2 Liter bidest. Wasser mit konzentriertem Ammoniak in Lösung gebracht und mit Salzsäure auf pH 7,2 eingestellt. Nach Zugabe von 1 g Acylase I wurde bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der pH Wert nachgestellt und der Ansatz nach weiteren 2 Tagen aufgearbeitet (57). Hierzu wurde mit Essigsäure auf pH 4,5 gebracht, mit Aktivkohle gerührt und filtriert. Das Filtrat wurde i.v. eingeengt auf 150 ml, wobei das O-Bzl-L-Serin in seidig glänzenden Blättchen auskristallisierte. Umkristallisiert wurde aus heissem Wasser. Ausbeute: 20 g (80%), Fp.: 211°C (Lit.: 213)
α^{D}_{20} = + 22,8° (c = 2 in 80% AcOH + 1 äquiv.HCl)

Lit.: α^{546}_{20} = + 26,9° (c = 2 in 80% AcOH + äquiv.HCl)

1.6 N^{im}-Benzyl-Histidin (His(Bzl)-OH) (MG 245)
Die Benzylierung erfolgte nach der Vorschrift von J.P.Greenstein und M.Winitz (58) in flüssigem Ammoniak. Dabei wurden aus 93,6 g (0.6 Mol) Histidin (freie Base) 124 g feuchtes Rohprodukt ernalten, aus dem durch Umkristallisieren

aus 70% igem Äthanol 90 g Benzylhistidin (61%) erhalten wurden. Fp.: 238 -240°C.

1.7 ω-Nitro-arginin (MG 219)
Das Nitrieren des Arginins erfolgte nach der Vorschrift von J.P.Greenstein und M.Winitz (59). Aus 30 g Arginin konnten 28 g Nitroarginin gewonnen werden (78%). Fp.: 261°C.

1.8 Glutaminsäure-γ-benzylester (MG 237)
Nach der Vorschrift von R.A.Boissonnas und St.Guttmann (60) wurden aus 73,5 g (0,5 Mol) Glutaminsäure 42 g (36%) Glutaminsäure-γ-benzylester erhalten mit einem Schmelzpunkt von 187°C (Lit. 189°C).

α_D^{25} = + 19,5° (c = 7,2 in AcOH)

Lit.: α_D^{23} = + 19,6° (c = 6,0 in AcOH)

Analyse:		C	H	N
	ber.	60,92	6,34	5,91
	gef.	60,96	6,62	5,95

Eine Vergleichsprobe der Fa. Schuchardt, München besass einen Schmelzpunkt von 170°C, war aber chromatographisch identisch mit dem hier beschriebenen Produkt.

2. Aminosäuremethylester

Allgemeine Arbeitsvorschrift: 0,5 Mol Aminosäure wurden in 100 ml absolutem Methanol suspendiert und mit HCl-Gas gesättigt. Nachdem das warme Methanol gesättigt war, wurde auf 0°C abgekühlt und wieder mit HCl-Gas gesättigt. Nach 5 Stunden wurde das Methanol abgezogen und der Vorgang mit frischem Methanol wiederholt. Nach 12 Stunden wurde die methanolische Salzsäure i.v. abgezogen und der Rückstand so lange mit Methanol i.v. behandelt, bis kein HCl-Geruch mehr wahrnehmbar war. Umkristallisiert wurde aus Methanol oder Essigester (mit 10% Methanol).

2.1 Tyrosin-methylester-hydrochlorid (MG 230)
Einwaage: 18,1 g (0,1 Mol) Ausbeute 17 g (74%) Fp.: 190°C
Umkristallisiert wurde aus Methanol.

2.12 Tyrosin-methylester (MG 195)
17,5 g Tyrosinmethylester-hydrochlorid wurden in Wasser gelöst und mit 2N NaOH am pH-Meter auf pH 7,5 titriert. Der Wendepunkt der Titrationskurve lag bei pH 6,5. Dabei fiel der Tyrosinmethylester aus und wurde aus Methyl-äthylketon umkristallisiert. Ausbeute: 10 g (70%), Fp.: 134°C.

Analyse:	ber.	C 62,20	H 6,28	N 7,21	Cl 0,00
	gef.	61,86	6,68	7,41	0,00

2.2 Valinmethylester-hydrochlorid (MG 167)
Aus 23 g (0,2 Mol) Valin wurden 26 g Valin-methylester-hydrochlorid erhalten. Ausbeute: 26 g (78%), Fp.: 168°(Me).

2.3 Leucinmethylester-hydrochlorid (MG 181)
Aus 26 g (0,2 Mol) Leucin wurden 21 g Leucinmethylester-hydrochlorid erhalten. Ausbeute: 21 g (60%), Fp.: 149°C
Umkristallisiert wurde aus Methanol.

2.4 Alaninmethylester-hydrochlorid (MG 139)
Aus 40 g (0,5 Mol) Alanin wurden 48 g Alaninmethylester-hydrochlorid erhalten, die aus Essigester (10% Methanol) umkristallisiert wurden. Ausbeute 48 g (73%), Fp.: 109°C (Lit. 109°C und 154°C (61)).

3. Boc-Aminosäurederivate

Boc-Azid wurde nach der Vorschrift von L.A.Carpino (62) dargestellt. Die Umsetzungen zu den Boc-Aminosäuren erfolgten nach der pH-Stat Methode von E.Schnabel (35). Die erhaltenen Ausbeuten sind in Tab. 11 zusammengefasst.

3.1 Boc-Benzylhistidin (MG 345)
Zur Synthese von Boc-His(Bzl)-OH schlägt E.Schnabel (35) drei Möglichkeiten vor. Zwei davon wurden versucht, lieferten aber keine guten Ausbeuten.
a) Mit Triäthylamin: 50 g (0,2 Mol) N^{im}-Bzl-Histidin wurden in Dioxan/Wasser (1:1) und 30 ml Triäthylamin suspendiert und mit 24 ml Boc-Azid 64 Stunden bei 4°C unter kräftigem Rühren umgesetzt. Vom nicht umgesetzten Amino-

säurederivat wurde abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde wiederholt i.v. mit Äthanol/Wasser und Äthanol behandelt, das Lösungsmittel endlich abgezogen und der Rückstand im Soxhlet-Apparat mit Essigester/Methanol (5%) durch Extraktion umkristallisiert.
Ausbeute: 15 g (21%), Fp.: 181°C.

Aminosäure	pH Wert	Reaktionszeit in Stunden	Ausbeute in %	Fp.
Ala	10,1	6	81	82
Gly	8,6	3	57	82
Tos-Lys	9,6	20	75	Öl
Pro	8,6	4	62	134
Val	9,5	25	60	78
Phe	10,1	16	57	85
Ser(Bzl)	9,4	10	98	Öl
Lys(Cbo)	10,2	9	92	Öl
Glu(Bzl)	9,3	30	35	Öl
Ile	10,2	12	96	68
Leu·1/2 H_2O	9,6	14	92	80

Tab. 11: Synthese von Boc-Aminosäurederivaten nach der pH-Stat Methode von E.Schnabel (35).

b) Mit Natronlauge: 24 g (0,12 Mol) N^{im}-Bzl-Histidin wurden nach der Vorschrift von E.Schnabel (35) mit 11,2 ml Boc-Azid bei pH 9,4 mit 4N NaOH 14 Stunden lang umgesetzt. Die Ausbeute an Boc-His(Bzl)-OH betrug 15 g (40%) vom Schmelzpunkt 178°C. Umkristallisiert wurde aus Pyridin/Essigester.

3.21 Boc-Nitro-arginin (MG 319)
14 g Nitroarginin wurden nach der pH-Stat Methode zu 20 g Boc-Nitro-arginin umgesetzt (75%). Fp.: 123°C

3.22 Boc-Arginin (MG 274)
Der zur katalytischen Hydrierung benötigte Palladiumkataly-

sator wurde nach J.P.Greenstein und M.Winitz (63) frisch hergestellt.
15 g (0,05 Mol) Boc-Nitro-arginin wurden in Methanol gelöst, 1 ml Eisessig zugegeben und mit 700 mg Katalysator durch reinsten Wasserstoff 5 Tage lang reduziert. Während der Reduktion wurde immer wieder mit Eisessig angesäuert, um entstehendes Ammoniak zu binden. Dann wurde vom Katalysator dekandiert und das Methanol abgezogen. Zurück blieb ein Öl, das dünnschichtchromatographisch neben Boc-Arginin nur noch ca. 5% Arginin enthielt. Um das Arginin zu entfernen, wurde das Öl in einer Gegenstromverteilung mit 6 Stufen zwischen Butanol/Wasser (1:1) verteilt. Das Butanol/Wassergemisch wurde im Hochvakuum abgezogen. Zurück blieben 8g Öl (61%), das dünnschichtchromatographisch einheitlich war (Laufmittel: Butanol,Eisessig,Wasser 3:1:1).

4. Boc-Aminosäure-p-nitrophenylester

Allgemeine Arbeitsvorschrift: 0,2 Mol Boc-Aminosäure und 0,26 Mol p-Nitrophenol wurden in 300 ml Essigester gelöst, auf 0°C abgekühlt und mit einer Lösung von 0,2 Mol DCCI in 50 ml Essigester versetzt. Nach 30 Minuten bei 0°C wurde noch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die organische Phase mit einer gesättigten $NaHCO_3$ Lösung mehrmals gewaschen. Getrocknet wurde mit Na_2SO_4, dann filtriert und das Lösungsmittel i.v. abgezogen. Umkristallisiert wurde aus Äther/Petroläther (30°C bis 50°C).

4.1 Boc-Gly-ONP (MG 296)
Aus 35 g Boc-Glycin wurden 30 g Boc-Glycin-p-nitrophenylester (52%) erhalten, der chromatographisch rein war.
Fp.: 70°C.

4.2 Boc-Ser(Bzl)-ONP (MG 413)
24 g Boc-Ser(Bzl)-OH (0,08 Mol) wurden zu 26 g Boc-Ser(Bzl)-ONP umgesetzt, der als Öl anfiel und sich chromatographisch einheitlich erwies (Laufmittel: Butanol,Eisessig,Wasser

3:1:1). Ausbeute: 26 g (76%).

4.3 Boc-Ala-ONP (MG 310)
66 g (0,2 Mol) Boc-Alanin wurden zu 75 g Boc-Ala-ONP umgesetzt. Ausbeute: 75 g (70%), Fp.: 78°C.

α_D^{20} = -54,5° (c = 2 in Methanol)

Lit.(64): α_D^{22} = -63,5° (c = 2 in Methanol)

4.4 Boc-Phe-ONP (MG 386,4)
90 g (0,3 Mol) Boc-Phenylalanin wurden zu 80 g Boc-Phe-ONP umgesetzt. Ausbeute: 80 g (60%), Fp.: 122°C
Lit.(64): 132°C

α_D^{20} = -17,5° (c = 2 in Methanol)

Lit.(64): α_D^{22} = -17,5°(c = 2 in Methanol

4.5 Boc-His(Bzl)-ONP (MG 466)
Die Darstellung des Boc-His(Bzl)-ONP, bisher noch nicht beschrieben, wurde analog einer Vorschrift von J.M.Stewart und J.D.Young (65) versucht.
Hierzu wurden 3,4 g (0,01 Mol) Boc-His(Bzl)-OH und 5,3 g (0,04 Mol) p-Nitrophenol in 30 ml DMF gelöst und auf -3°C abgekühlt. Dann wurde eine ebenfalls gekühlte Lösung von 2,3 g (0,011 Mol) DCCI in 4 ml DMF portionsweise zugegeben und 8 Stunden bei 3°C stehen gelassen. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, DMF im Hochvakuum abgezogen, der Rückstand in 100 ml Äther gelöst und mehrmals mit gesättigter $NaHCO_3$ Lösung gewaschen. Die Ätherphase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und der Äther abgezogen. Zurück blieb ein braunes Öl, das dünnschichtchromatographisch noch 30% Boc-His(Bzl)-OH enthielt. Daher wurde nochmals mit verdünnter Na_2CO_3 Lösung gewaschen, um das nicht umgesetzte Boc-His(Bzl)-OH als Natriumsalz abzutrennen. So konnten 2 g (45%) hellgelbes Öl gewonnen werden, das dünnschichtchromatographisch einheitlich erschien

(Laufmittel: Butanol, Eisessig, Wasser 3:1:1) und ohne weitere Reinigung und Untersuchung verwendet wurde.

5. Dipeptide

5.1 Boc-Val-Tyr(OH)-OMe (MG 364,1)

10,9 g (0,05 Mol) Boc-Valin und 9,75 g (0,05 Mol) Tyrosinmethylester wurden zusammen in 100 ml Essigester gelöst, auf 4°C abgekühlt und mit einer kalten Lösung von 10,3 g (0,05 Mol) DCCI in 20 ml Essigester versetzt. Nach 3 Tagen wurde 1 ml Eisessig zugesetzt und nach 10 Minuten vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand mehrmals aus Methyl-äthylketon/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute: 5 g (25%), Fp.: 160°C

Analyse:				
	ber.	C 60,9	H 7,6	N 7,1
	gef.	61,2	7,9	7,2

Aminosäureanalyse: Val:Tyr = 1,00:0,92

5.21 Boc-Pro-Val-OMe (MG 328)

50,1 g (0,3 Mol) Valinmethylester-hydrochlorid wurden mit 30,3 g (0,3 Mol) Triäthylamin in Essigester versetzt und nach 10 Minuten vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert. Zu dieser Lösung wurden 2[illegible] g (0,2 Mol) Boc-Prolin, in 100 ml Methylenchlorid gelöst, gegeben und mit einer gesättigten Lösung von 61,8 g (0,3 Mol) DCCI in Methylenchlorid versetzt. Nach zwei Tagen wurde vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht, mit 0,01N HCl und $NaHCO_3$ Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen der Lösungsmittel wurden 70 g Öl erhalten, die nicht kristallisiert werden konnten. Chromatographisch erwies sich das Öl als einheitlich (Laufmittel: Butanol, Eisessig, Wasser 3:1:1) und wurde daher sofort zu 5.22 weiterverarbeitet.

5.22 Boc-Pro-Val-OH (MG 314)

70 g Boc-Pro-Val-OMe wurden in 100 ml einer alkoholischen Lösung von Kaliumhydroxid (20%) aufgenommen und 3 Stunden

stehen gelassen. Dann wurde auf pH 5 angesäuert und ausgeäthert. Die Ätherphase wurde vorsichtig mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Nach 6 Monaten war ein Teil kristallisiert, der abgesaugt und mit Äthanol gewaschen wurde. Ausbeute 10 g , Fp.: über 330°C. Chromatographisch rein (Laufmittel: Butanol, Eisessig, Wasser 3:1:1)
Aminosäureanalyse: Val:Pro = 1,00:0,93

5.3 Boc-Lys(Tos)-Val-OMe (MG 513)
4,25 g (0,025 Mol) Valinmethylester-hydrochlorid wurden mit 2,5 g (0,025 Mol) Triäthylamin in Methylenchlorid versetzt, 10 g (0,025 Mol) Boc-Lys(Tos)-OH in Methylenchlorid zugegeben und mit 9,5g (0,05 Mol) DCCI in Methylenchlorid versetzt. Nach 4 Tagen wurde 1 ml Essigsäure zugegeben und nach 10 Minuten vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Das Lösungsmittel wurde i.v. abgezogen, der Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Das Produkt war dünnschichtchromatographisch noch nicht einheitlich, daher wurde es aus Methyl-äthylketon/Petroläther nochmals umkristallisiert. Ausbeute: 4,8 g (27%), Fp.: 108°C.

Analyse:					
	ber.	C 56,12	H 7,59	N 8,21	S 6,24
	gef.	55,74	7,94	8,27	6,46

Aminosäureanalyse: Lys:Val = 1,11:1,16

5.4 Boc-Ala-Leu-OMe (MG 316)
9,1 g (0,05 Mol) Leucinmethylester-hydrochlorid wurden in wenig Methylenchlorid gelöst und mit 5 g (0,05 Mol) Triäthylamin versetzt. Zu dieser Lösung wurden 9,5 g (0,05 Mol) Boc-Alanin in 10 ml Methylenchlorid zugesetzt und nach Abkühlen auf -10°C portionsweise eine Lösung von 10,3 g (0,05 Mol) DCCI in wenig Methylenchlorid zugegeben. Nach 3 Tagen wurde 1 ml Eisessig zugegeben und nach 10 Minuten filtriert. Das Filtrat wurde i.v. eingeengt und der Rückstand aus heissem Methanol unter tropfenweisem Zugeben von Wasser kristallisiert. Ausbeute: 5 g (33%), Fp.: 178 bis 183°C. Dünnschichtchromatographisch erwies

sich das Produkt als einheitlich (Laufmittel: Butanol, Eisessig, Wasser 3:1:1). Das ^{1}H-NMR Spektrum zeigte ein Verhältnis der Esterprotonen (3) zu den Protonen der Boc-Gruppe (9) von 1:2,9.

5.5 Boc-Leu-Ala-OMe (MG 316)
Die Synthese wurde analog 5.4 durchgeführt. Aus einem Ansatz von 0,05 Mol konnten 10 g (65%) chromatographisch reines Dipeptid erhalten werden, das gleich weiter zum TFA-Derivat umgesetzt wurde.

6. TFA-Dipeptid-methylester

Die unter 5 aufgeführten Dipeptide wurden alle nach der unten angegebenen Arbeitsvorschrift in ihre Trifluoracetylderivate überführt.

1 g Dipeptid-methylester wurde in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst und mit 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden die Trifluoressigsäure und das Anhydrid i.v. abgezogen und der Rückstand mehrmals mit Methanol im Vakuum behandelt. Anschliessend wurde im Hochvakuum getrocknet.

Die TFA-Derivate von Val-Tyr(OH)-OMe (Fp.: 205°C) und Ala-Leu-OMe (Fp.: 149°C) konnten kristallin erhalten werden, die übrigen Derivate waren ölig. Die ^{1}H-NMR Spektren liessen auf saubere Produkte schliessen.

VII. Reinigung der Lösungsmittel

1. Methylenchlorid. Verwendet wurde Methylenchlorid p.a. (E.Merck, Darmstadt), das durch Rückflusskochen mit Molekularsieb 4 Å 3 Stunden lang getrocknet und über Na_2CO_3 destilliert wurde.

2. Äthanol. Äthanol (vergällt mit ca. 10% Petroläther, 1% Wassergehalt) wurde mit Natrium getrocknet (10 g Na/l) und über eine 1 m Füllkörperkolonne destilliert. Der Vor-

lauf (Petroläther) wurde verworfen (ca. 20%).

3. Triäthylamin. 500 ml Triäthylamin (Riedel de Häen) wurden mit 50 ml Naphtylisocyanat versetzt, nach 30 Minuten filtriert und 3 Stunden am Rückfluss erhitzt. Destilliert wurde bei Normaldruck über eine 30 cm Vigreuxkolonne.

4. Essigsäure. Essigsäure p.a. (E.Merck, Darmstadt) wurde 6 Stunden am Rückfluss über P_2O_5 erhitzt, frisches P_2O_5 zugegeben und bei Normaldruck über eine 1 m Vigreuxkolonne destilliert.

5. 1N HCl/Eisessig. In genau abgewogene 500 g Essigsäure (mit P_2O_5 nach VII,4 getrocknet) wurde HCl-Gas eingeleitet bis das Gewicht um 17,5 g zugenommen hatte. Die Lösung wurde zu Beginn jeder Synthese frisch hergestellt.

6. Dimethylformamid. 4 Liter Dimethylformamid (LAB Merck), 200 ml Wasser und 800 ml Benzol reinst (E.Merck, Darmstadt) wurden azeotrop destilliert bis ein Siedepunkt von 151°C erreicht war (1 m Vigreuxkolonne). Dann wurde unter Stickstoff und vermindertem Druck über die Kolonne so destilliert, dass der Siedepunkt zwischen 40 und 50°C lag. Die ersten 500 ml Destillat wurden verworfen. Dann wurde nach je 200 ml mit 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol (2,4-Dinitrofluorbenzol) auf Amine geprüft (20): 0,5 ml Dimethylformamid wurden mit 0,5 ml Reagenzlösung (20λ 2,4-Dinitrofluorbenzol in 100 ml Äthanol) versetzt. Nach 30 Minuten färbte sich die Probe bei Anwesenheit von Aminen gelb.
Nach dem Vorlauf von 1,5 Liter destillierte reines Dimethylformamid über.
Die ganze Destillationsapparatur wurde mit schwarzem Papier vor Licht geschützt, da unter Lichteinfluss (Neonleuchtröhre im Abzug) im Destillat mehr Amine gefunden wurden, als im Destillationskolben.
Aufbewahrt wurde das Dimethylformamid in braunen Flaschen unter Stickstoff bei 4°C. Unter diesen Bedingungen konnte innerhalb von 3 Tagen keine Bildung von Aminen festgestellt werden.

VIII. Geräte

Beckman Unichrom Amino Acid Analyser

LKB Gas Chromatograph - Mass Spectrometer 9000[+])

pH Meter, Metrohm Dosimat (10 ml) und Präzisions Potentiometer 353 von Metrohm AG., Herisau, Schweiz

Die Elementaranalysen wurden von Herrn H.J.Wurmstich im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

[+]) Herrn Graeme Nicholson danke ich für die Aufnahme und Auswertung von Gaschromatogrammen und Massenspektren.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildung von Fehlsequenzen während der Merrifieldsynthese von Peptiden wurde mit mehreren analytischen Methoden (GC, MS, ^{19}F-NMR) untersucht. Es wurde eine semiquantitative Methode entwickelt, die es gestattet, in kurzer Zeit mit hinreichender Genauigkeit, den Umsatz bei den einzelnen Kupplungsschritten zu bestimmen, ohne dabei in die Reaktion einzugreifen. Auch eine kinetische Kontrolle des Umsatzes kann mit ihr durchgeführt werden.

Mit verschiedenen Methoden wurde der Verlauf mehrerer Peptidsynthesen verfolgt. Dabei hat sich gezeigt, dass bei dem Dodekapeptid $(Leu\text{-}Ala)_6$ mit zunehmender Kettenlänge der Umsatz schlechter wird. Dies macht sich bei der Kupplung von Boc-Leucin an das Peptidpolymere stärker bemerkbar, als bei der Kupplung von Boc-Alanin.

Ausserdem wurde festgestellt, dass p-Nitro-phenylester von Boc-Aminosäuren mit wesentlich schlechteren Ausbeuten kuppeln, als die mit Dicyclohexylcarbodiimid aktivierten Boc-Aminosäuren. Es werden grosse Überschüsse an Reagentien und lange Reaktionszeiten (bis zu Tagen) benötigt.

Die während der Kupplung vorliegenden freien Aminogruppen unterliegen Nebenreaktionen, die sicher nachgewiesen aber nicht eindeutig aufgeklärt werden konnten.

Die Synthese mehrfunktioneller geschützter Aminosäuren wurde durch Ausarbeiten einer neuen Methode wesentlich vereinfacht, die Ausbeuten verbessert.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1) R.B.Merrifield, Federation Proc., 21, 412 (1962)
2) R.B.Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 85, 2149 (1963)
3) J.T.Sheehan & G.P.Hess, J.Am.Chem.Soc., 77, 1067 (1955)
4) J.T.Sheehan, M.Goodman & G.B.Hess, ib., 78, 1367 (1956)
5) R.B.Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 86, 304 (1964)
6) F.Weygand & R.Obermeier, Z.Naturforsch., 23b, 1390 (1968)
7) K.Fuko, S.Karlsson & J.Porath, Acta Chem.Scand., 22, 3342 (1968)
8) L.C.Dorman, Tetrahedron Letters No. 28, 2319 (1969)
9) E.Bayer, G.Jung, W.König, Z.Naturforsch., 23b, 924 (1967)
10) E.Bayer, H.Eckstein, H.Hagenmaier & G.Jung, unveröffentlicht
11) E.Bayer, H.Hagenmaier, G.Jung & W.König, Peptides 1968, North Holland Publ.Comp., Amsterdam 1968, p. 162
12) E.Bayer, H.Eckstein, K.Hägele, W.König, W.Brüning, H.Hagenmaier & W.Parr, J.Am.Chem.Soc., 92, 1735 (1970)
13) E.Bayer, Chemie für Betrieb und Labor 193 (1969)
14) E.Bayer, Proceedings of the 1st American Peptide Symposium, Marcel Dekker, New York, im Druck
15) O.Grahl-Nielsen & G.L.Tritsch, Biochem., 8, 187 (1969)
16) R.E.Sievers, F.Bayer & P.Hunziker, Nature, 233, 179 (1969)
17) M.Bodanszky & J.T.Sheehan, Chem.Ind., 1597 (1966)
18) S.Förnle, Z.Physiol.Chem., 348, 1355 (1967)
19) V.Gut & J.Rudinger in "Peptides 1968", E.Bricas, Ed., North Holland Publ.Comp., Amsterdam 1968
20) J.M.Stewart & J.D.Young, Solid Phase Peptide Synthesis, p. 31, W.H.Freeman and Comp., San Francisco, 1969
21) K.Brunfeldt, P.Roepstorff & J.Thomsen, Acta Chem.Scand., 23, 2906 (1969)

22) K.Brunfeldt, J.Halstrom & P.Roepstorff, ib., 23, 2830 (1969)
23) Einzelheiten und Literaturübersicht s. G.Gassmann, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1967
24) H.Hagenmaier, Tetrahedron Letters, 283 (1970)
25) H.Frank & R.Uhmann, Universität Tübingen, private Mitteilungen
26) K.Kito & T.Murachi, J.Chrom., 44, 205 (1969)
27) M.Bodanszky, J.Meienhofer & V.Du Vigneaud, J.Am.Chem. Soc., 82, 3195 (1960)
28) M.Bodanszky & J.T.Sheehan, Chem.Ind., 1597 (1966)
29) M.Bodanszky & J.T.Sheehan, ib., 1423 (1964)
30) R.H.Mazur, J.Org.Chem., 28, 2498 (1963)
31) M.Bodanszky & V.Du Vigneaud, J.Am.Chem.Soc., 81, 5688 (1959)
32) P.Sieber & B.Iselin, Helv., 51, 622 (1968)
33) E.Wünsch, G.Fries & A.Zwick, Ber., 91, 542 (1958)
34) R.Roeske, F.H.Stuart, R.J.Stedman & V.Du Vigneaud, J.Am.Chem.Soc., 78, 5883 (1956)
35) E.Schnabel, Liebigs Ann.Chem., 702, 188 (1967)
36) W.Grassmann, E.Wünsch, P.Deufel & A.Zwick, Ber., 91, 538 (1958)
37) J.L.Wood & V.Du Vigneaud, J.Biol.Chemistry, 134, 413 (1960)
38) J.Greenstein & M.Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Vol. III, p. 2233, John Wiley & Sons, Inc. New York-London 1960
39) Hoppe-Seyler Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch Chemischen Analyse Bd. III, S. 1670, Springer-Verlag, Berlin·Göttingen·Heidelberg 1955
40) E.Schröder & K.Lübke, "The Peptides", Vol. I, Academic Press, New York and London 1965
41) H.C.Beyermann & J.S.Bontekoe, Proc.Soc., 249 (1961)
42) R.Uhmann, Universität Tübingen, private Mitteilung

43) Eine Literaturübersicht geben M.Bodanszky & A.A.Ondetti in "Peptide Synthesis" p. 75, Interscience Publishers, New York·London·Sydney 1966
44) R.Schwyzer, Helv.Chim.Acta, 43, 1910 (1960)
45) E.Wünsch, G.Fries & A.Zwick, Ber., 91, 542 (1958)
46) R.Roeske, F.H.Stuart, R.J.Stedman & V.Du Vigneaud, J.Am.Chem.Soc., 78, 5883 (1956)
47) H.Zahn, Ber., 89, 407 (1956)
48) G.Fölsch & K.Serck-Hanssen, Acta Chem.Scand., 13, 1243 (1959)
49) K.Hägele, Universität Tübingen, private Mitteilung
50) G.Brauer, Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie, Bd. I, 422, 2.Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1960
51) C.B.Anfinsen & M.Ohno, J.Am.Chem.Soc., 89, 5994 (1967)
52) Jander, Jahr, Knoll, Massanalyse. Sammlung Göschen, S.222, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1963, Bd.221/221a
53) R.Roeske, F.H.C.Stuart, R.J.Stedman & V.Du Vigneaud, J.Am.Chem.Soc., 78, 5883 (1956)
54) R.Schwyzer & P.Sieber, Helv.Chim.Acta, 41, 1582 (1958)
55) K.Schlögel & H.Fabischowitz, Mh.Chem., 84, 950 (1953)
56) S.M.Birnbaum, L.Levitinov, R.B.Kingsley & J.P.Greenstein, J.Biol.Chem., 194, 455 (1952)
57) Hoppe-Seyler Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch Chemischen Analyse Bd. III, S. 1670, Springer-Verlag, Berlin·Göttingen·Heidelberg 1955
58) J.P.Greenstein & M.Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Vol. II, 1067 (s.(38))
59) J.P.Greenstein & M.Winitz, ib., Vol. III, 1852
60) St.Guttmann & R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta, 41, 1864 (1958)
61) J.P.Greenstein & M.Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Vol. I, 925 (s.(38)
62) L.A.Carpino, J.Am.Chem.Soc., 79, 4427 (1957)

63) J.P.Greenstein & M.Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Vol. II, 1233 (s.(38)
64) R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta, 46, 1637 (1963)
65) J.M.Stewart and J.D.Young, Solid Phase Peptide Synthesis, p. 30, W.H.Freeman & Comp., San Francisco 1969

Lebenslauf

Am 23. März 1942 wurde ich als Sohn des Studienrats Lothar Eckstein und seiner Ehefrau Elisabeth Eckstein, geb. Weller, in Aalen/Württ. geboren.

Im Herbst 1948 trat ich in die Volksschule Aalen ein und kam 1952 in das Schubartgymnasium Aalen, wo ich 1962 das Abitur ablegte. Im März 1962 begann ich in Tübingen das Chemiestudium, bestand im Mai 1965 das Vordiplomexamen und im Juli 1967 das Hauptdiplomexamen.

Unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer führte ich vom Oktober 1967 bis Mai 1968 die experimentelle Diplomarbeit und vom Juni 1968 bis März 1970 die experimentelle Doktorarbeit durch.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den Herren Professoren
E. BAYER, W. BUES, A. GOTTSCHALK, M. HANACK, G. KORTÜM, H. KRÜGER, H. MAUSER, G. MÖLLENSTEDT, EU. MÜLLER, G. OPITZ, W. RÜDORFF, H.G. TRIESCHMANN, G. WEITZEL, H. WIELANDT.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681